

# CHARAKTERISIERUNG DER ANTIVIRALEN WIRKUNG VON ORLISTAT ALS ARZNEISTOFF DER ADIPOSITAS-BEHANDLUNG

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Elisabeth Ammer  
geboren am 13. 10. 1990 in München

## Gutachter

1. Prof. Dr. Andreas Henke, Jena
2. Apl. Prof. Dr. Regine Heller, Jena
3. PD Dr. Albert Heim, Hannover

Datum des Staatsexamens: 20.12.2017

Datum der Verteidigung: 4.7.2017

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
<b>1 Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Zusammenfassung .....</b>	<b>4</b>
<b>3 Einleitung .....</b>	<b>6</b>
<b>4 Zielstellung .....</b>	<b>25</b>
<b>5 Material und Methoden .....</b>	<b>26</b>
5.1 Zellkultivierung.....	26
5.2 Ablösen und Passagieren der Zellen .....	26
5.3 Bestimmung der Zellzahl und Infektion .....	26
5.4 Verwendete Virusstämme.....	27
5.5 Zytotoxizitätstest mittels WST-1 .....	27
5.6 Quantifizierung der Viruslast nach Substanzapplikation .....	28
5.7 Virustiterbestimmung mittels TCID <sub>50</sub> -Test .....	29
5.8 Berechnung des IC <sub>50</sub> -Wertes .....	30
5.9 Einfluss der Inhibition der Fettsäuresynthese mittels Orlistat und der Fettsäureaufnahme mittels Phloretin auf die Replikation von CVB3-EGFP .....	31
5.10 Darstellung der Fettsäureaufnahme in CVB3-infizierte Zellen.....	32
5.11 Einfluss der Inhibition der Fettsäuresynthese mittels Orlistat und der Fettsäureaufnahme mittels Phloretin auf die Darstellung der Fettsäureaufnahme in CVB3-EGFP-infizierten Zellen .....	33
5.12 Erstellung elektronenmikroskopischer Bilder .....	34
5.13 Statistische Auswertung.....	34
<b>6 Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
6.1 Überblick .....	36
6.2 Orlistat.....	36
6.2.1 Zytotoxizitätstest für Orlistat mittels WST-1.....	36
6.2.2 Einfluss der Fettsäuresynthese-Inhibition mittels Orlistat auf die Virusreplikation .....	37
6.2.3 CVB3-EGFP und Orlistat.....	44
6.3 Phloretin .....	46
6.3.1 Zytotoxizitätstest für Phloretin mittels WST-1 .....	46
6.3.2 Einfluss der Fettsäureaufnahme-Inhibition mittels Phloretin auf die Virusreplikation .....	46
6.3.2 CVB3-EGFP und Phloretin.....	49
6.4 Orlistat und Phloretin .....	50

6.4.1	Zytotoxizitätstest für Orlistat + Phloretin mittels WST-1 .....	50
6.4.2	Einfluss von Fettsäuresynthase-Inhibition mittels Orlistat und Fettsäureaufnahme-Inhibition mittels Phloretin auf die Virusreplikation .....	51
6.4.3	CVB3-EGFP und Orlistat + Phloretin .....	53
6.5	Nachweis der Fettsäureaufnahme mit Bodipy .....	55
6.5.1	Nachweis der Fettsäureaufnahme mittels Bodipy nach Orlistat-Applikation .....	58
6.5.2	Nachweis der Fettsäureaufnahme mittels Bodipy nach Phloretin-Applikation .....	62
6.5.3	Nachweis der Fettsäureaufnahme mittels Bodipy nach Orlistat- und Phloretin-Applikation .....	65
6.6	Elektronenmikroskopische Aufnahmen .....	68
6.6.1	Elektronenmikroskopische Darstellung nicht infizierter GMK-Zellen .....	68
6.6.2	Elektronenmikroskopische Darstellung virusinfizierter GMK-Zellen .....	69
6.6.3	Elektronenmikroskopische Darstellung orlistat-behandelter und CVB3-infizierter GMK-Zellen .....	71
6.6.4	Elektronenmikroskopische Darstellung phloretin-behandelter und CVB3-infizierter GMK-Zellen .....	72
<b>7</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>74</b>
<b>8</b>	<b>Schlussfolgerungen .....</b>	<b>85</b>
<b>9</b>	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis .....</b>	<b>87</b>
<b>10</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>99</b>
10.1	Ehrenwörtliche Erklärung .....	99
10.2	Lebenslauf .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
10.3	Danksagung .....	100



# 1 Abkürzungsverzeichnis

°C: Grad Celsius

µl: Mikroliter

µm: Mikrometer

µM: Mikromolar

Abb.: Abbildung

ACE-Hemmer: angiotensin converting enzyme Hemmer

ACP: acyl carrier protein

Arf-1: ADP ribosylation factor 1

Atg: autophagy related genes

AUG: Adenin, Uracil, Guanin

Ca<sup>2+</sup>: Kalzium

cAMP: cyclic adenosine monophosphate

CAR: Coxsackievirus- and Adenovirus receptor

Caspase: cysteine aspartases

C-Atom: Kohlenstoffatom

CD: cluster of differentiation

CO<sub>2</sub>: Kohlendioxid

CoA: Coenzym A

COP: coated protein complex

CPE: cytopathic effect

CREB: cAMP responsive element binding protein

CVB3: Coxsackievirus des Serotyps B3

CVB3-EGFP: Coxsackievirus des Serotyps B3 mit EGFP gekoppelt

DAF: decay accelerating factor

DCM: dilatative Kardiomyopathie

DMEM: Dulbecco's modified eagle's medium

DMSO: dimethyl sulfoxide

DNA: desoxyribonucleic acid

EGFP: enhanced green fluorescent protein

eIF: eukaryotic initiation factor

EKG: Elektrokardiogramm  
ER: Endoplasmatisches Retikulum  
Fab: antigen binding fragment  
FKS: fetales Kälberserum  
g: Erdbeschleunigung ( $9,81 \text{ m/s}^2$ )  
GBF-1: golgispecific brefeldin A  
GFP: green fluorescent protein  
GMK: Green Monkey Kidney Zellen  
Golgi: Golgi-Apparat  
h: Stunde  
HUVEC: Human umbilical vein endothelial cell  
HeLa: menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms  
IC<sub>50</sub>: mittlere inhibitorische Konzentration  
ICAM: intercellular adhesion molecule  
IFN: Interferon  
Ig: Immunglobulin  
IKKε- Kinase: Inhibitor of nuclear factor NFκB Kinase ε  
IL: Interleukin  
IRES: internal ribosome entry site  
IRF: interferon regulatory factor  
KCl: Kalium-Chlorid  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Kaliumdihydrogenphosphat  
M: Molar  
MDA: melanoma differentiation antigen  
MHC: major histocompatibility complex  
min: Minute  
ml: Milliliter  
mM: millimolar  
MOI: multiplicity of infection  
mRNA: messenger RNA  
MW: Mittelwert  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: Dinatriumhydrogenphosphat

NaCl: Natrium-Chlorid  
NaHCO<sub>3</sub>: Natriumhydrogencarbonat  
NLS: nuclear localization sequence  
nm: Nanometer  
NO: Stickstoffmonoxid  
NTR: non translated region  
OCT: octamer binding protein  
p. i.: post infectionem  
PABP: Poly-A binding protein  
PAMP: pathogen associated molecular pattern  
PBS: phosphate buffered saline  
PCR: polymerase chain reaction  
PI-4-K: phosphatidylinositol 4-kinase  
PI-4-P: phosphatidylinositol 4-phosphate  
PRR: pattern recognition receptor  
RIG: retinoic acid inducible gene  
RNA: ribonucleic acid  
SD: Standardabweichung  
Tab.: Tabelle  
TANK: TRAF family member associated NF-kappa-B activator  
TBK1-Kinase: TANK-binding kinase  
TBP: TATA-Box binding protein  
TCID: tissue culture infectious dose  
Th 1 bzw. 2: T-Helferzelle 1 bzw. 2  
TLR: toll-like receptor  
TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor  $\alpha$   
TRAF: tumor necrosis factor receptor associated factor  
VP1-4: Virusprotein 1-4  
VPg: virales genomassoziiertes Protein  
WST-1: water soluble tetrasolium 1  
ZNS: Zentrales Nervensystem

## 2 Zusammenfassung

Durch Coxsackievirus B3 (CVB3) ausgelöste Myokarditiden stellen ein großes therapeutisches Problem dar, da nach wie vor keine ursächliche Therapie der Erkrankung möglich ist. Gegenstand der aktuellen Forschung in diesem Bereich sind unter anderem Rezeptorblocker, Substanzen zur Capsid-Stabilisierung und Immunmodulation, sowie Protease-Hemmer. Die Modifikation des Fettstoffwechsels der Wirtszelle und die daraus resultierende Einflussnahme auf die Replikation von CVB3 könnte ein weiterer Ansatzpunkt sein. Die für die Vermehrung von CVB3 notwendige Bildung von sogenannten Viroplasmen erfolgt aus zelleigenen Fettsäuren. Eine Hemmung des zellulären Fettsäurestoffwechsels mit folglich vermindertem Fettsäureangebot könnte somit auch Einfluss auf die Viroplasmenbildung und damit die virale Replikation haben.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es den Fettstoffwechsels der Wirtszellen zu inhibieren und die Folgen auf die Replikation von CVB3 zu untersuchen. Dazu wurden Orlistat und Phloretin verwendet. Beide Substanzen finden in anderem Kontext bereits in der Praxis Verwendung. Orlistat wird zur Gewichtsreduktion bei Fettleibigkeit eingesetzt, Phloretin in der Dermatologie. Auf zellulärer Ebene beruht die Wirkung von Orlistat Fettstoffwechsel auf der Hemmung der Fettsäuresynthese im Fettstoffwechsel der Zelle. Phloretin greift nicht an der endogenen Fettsäureproduktion an, sondern am Import von freien Fettsäuren aus dem Extrazellularraum. Neben Toxizitätstests der Substanzen wurden Tissue-culture-infectious dose-50 Tests (TCID<sub>50</sub>), fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt.

Nach der Behandlung der Zellen mit Orlistat konnten signifikant niedrigere Virustiter ermittelt werden, als bei den unbehandelten Kontrollen. In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten sich auch weniger Viroplasmen. Der Effekt ließ 10 Stunden nach Infektion (10 h p. i.) nach. Diese Beobachtung legte nahe, dass die irreversible Hemmung der Fettsäuresynthese nach einigen Stunden möglicherweise durch andere Mechanismen kompensiert wurde und die vermehrte Expression der Fettsäuresynthese in infizierten Zellen durch Orlistat nicht mehr gedeckt werden konnte. Der negative Effekt von Orlistat auf die Virusreplikation fiel bei Substanzzugabe zu bereits infizierten Zellen deutlicher aus, als bei prophylaktischer Applikation. Es ist denkbar, dass bei vorbeugender Gabe der Ausgleich des Fettsäuremangels durch alternative Wege zum Zeitpunkt der Infektion bereits eingesetzt

hatte. Somit standen genug Fettsäuren für die Viroplasmenbildung zur Verfügung und der hemmende Effekt auf die Replikation fiel geringer aus.

Der Import von Fettsäuren aus dem Extrazellularraum stellt die zweite potente Möglichkeit der Fettsäurebereitstellung dar. Dieser Vorgang wurde durch Phloretin gehemmt. In den durchgeführten Versuchen wurde dabei deutlich, dass der Einfluss von Phloretin auf die Replikation von CVB3 nur marginal war. Auch in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigte sich nach Phloretin-Gabe eine unverändert hohe Anzahl an Viroplasmen. Durch Phloretin wird vor allem in hohen Dosen die Zellmembran geschädigt, was zur erleichterten Virusfreisetzung führen könnte. Womöglich hob diese Wirkung den hemmenden Effekt des reduzierten Fettsäureimports auf. Des Weiteren erschien eine Kompensation der inhibierten Aufnahme durch eine starke Expression der Fettsäuresynthase wahrscheinlich und erklärt somit die geringere Wirkung von Phloretin auf die Replikation von CVB3.

Die Verknüpfung von gehemmter Fettsäureproduktion und gehemmtem Import erfolgte durch die zeitgleiche Gabe beider Substanzen. Hier zeigte sich ein deutlicher Effekt auf die Virusreplikation. Die Titer der behandelten Proben lagen sowohl unter denen der Unbehandelten, als auch unter denen, die nur mit Orlistat bzw. Phloretin behandelt worden waren. Zudem schien die Wirkdauer von Orlistat verlängert. Es ist möglich, dass dies auf einer nur langsam einsetzenden Kompensation mittels freier Diffusion von Fettsäuren beruht.

Durch die durchgeführten Versuche konnte die Abhängigkeit der Replikationsrate von einer suffizienten Fettsäureverfügbarkeit nachgewiesen werden. Vor allem die Kombination von Orlistat und Phloretin stellte hier einen interessanten neuen Ansatz in der Therapie der CVB3-induzierten Myokarditis dar.

Charakterisierung der antiviralen Wirkung von Orlistat als Arzneistoff der Adipositas-Behandlung

Vorgelegt von Elisabeth Ammer

### 3 Einleitung

„Der Berufsfußballer Axel Jüptner (...) (spielte) 113-mal (...) in der Ersten Bundesliga, bei drei Vereinen stand er unter Vertrag: VfB Stuttgart, Bayer Uerdingen, FC Carl Zeiss Jena. Einen Tag vor seinem 29. Geburtstag starb er. Ines Jüptner holt am 23. April ihren Mann vom Jenaer Ernst-Abbe-Sportfeld ab, wo der Mittelfeldspieler zum ersten Mal seit anderthalb Wochen wieder trainiert hat. Er ist eine Dreiviertelstunde lang locker um den Platz getrabt. Nach dem Duschen steigt er in das Mercedes-Coupé, gibt seiner Frau einen Kuss. (...) Neben dem Auto steht ein Mannschaftskollege, der Axel Jüptner Zeichen macht. Nur eine kurze Frage noch. "Moment", sagt Jüptner und will die Scheibe herunterlassen. Das schafft er nicht mehr. Er sackt auf dem Beifahrersitz zusammen. Die exakte Todesursache ermittelte ein Gerichtsmediziner drei Tage später bei der Obduktion: kardiogener Schock, landläufig bekannt als plötzlicher Herztod. Es gibt viele Fälle, in denen junge Menschen plötzlich zusammenbrechen und sterben - ohne Vorwarnung, ohne Logik, ohne Schuld (...)“ (Wulzinger 2000)

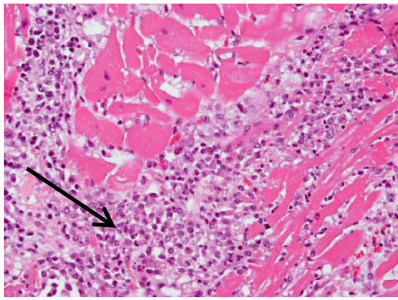
Die Hauptursache für den plötzlichen Herztod, vor allem junger gesunder Menschen, ist, wie im oben beschriebenen Fall, eine Entzündung des Herzmuskels (Feldman und Mc Namara 2000, Rose 2014). Bei jedem dritten Patienten geht eine Myokarditis in eine Dilatative Kardiomyopathie (DCM) über (Pankuweit *et al.* 2002, Schultheiss und Kuhl 2006). Schätzungen zufolge leiden 1-5 % der Bevölkerung an einer Herzmuskelentzündung, die auf Grund der vielfältigen Symptome oft nicht richtig als solche diagnostiziert wird (Pankuweit *et al.* 2002).

Eine Myokarditis ist durch die Schädigung von Herzmuskelzellen und Infiltration mit Entzündungszellen charakterisiert (Trochu *et al.* 2012). Es wird hierbei zwischen infektiösen und nicht infektiösen Formen der Myokarditis unterschieden (Böcker *et al.* 2004). Ursachen für nicht infektiöse Myokarditiden sind meist immunpathologische Mechanismen wie eine Riesenzellmyokarditis (autoimmune Form), eine hypereosinophile Myokarditis (Hypersensitivitäts-Reaktion), eine rheumatische Myokarditis oder auch Überempfindlichkeitsreaktionen auf beispielsweise Medikamente (Penicillin, Sulfonamide, Methyldopa u. a.) sowie Drogen (Kokain) (Böcker *et al.* 2004, Cooper und Elamm 2012, Guertl *et al.* 2000, Ni *et al.* 2014, Suzuki *et al.* 2011).

Zu den Auslösern der infektiösen Myokarditis zählen bakterielle Erreger wie Staphylokokken, Pseudomonaden, Proteus, Klebsiellen, Chlamydien oder der Diphtherie-Erreger

*Corynebakterium diphtheriae* (Guan *et al.* 2010). Bei immundefizienten Patienten spielen auch Pilzinfektionen mit *Candida albicans* oder Aspergillen eine wichtige Rolle (Böcker *et al.* 2004). Vor allem in Entwicklungsländern sind ferner Infektionen mit *Trypanosoma cruzi* eine weitere Ursache für die Entstehung einer Herzmuskelentzündung (Machado *et al.* 2013). Doch auch Viren können eine Myokarditis auslösen. Hierbei zählen das Zytomegalivirus, das Hepatitis-C-Virus, das Influenzavirus, das Parvovirus B19 und das HI-Virus zu den nicht primär kardiotropen Vertretern (Maisch *et al.* 1993, Pankuweit *et al.* 1998, Pankuweit *et al.* 2000, Shaboodien *et al.* 2013). Adenoviren und Enteroviren, und unter letzteren speziell das Coxsackievirus, werden hingegen zu den primär kardiotropen Viren gerechnet (Guan *et al.* 2010, Gupta *et al.* 2008, Pankuweit *et al.* 1998, Sagar *et al.* 2012). Dabei ist bei 20-25% (Kim *et al.* 2001), bei Kindern sogar bis zu 60%, aller bekannten Fälle das Coxsackievirus die Ursache für die Entzündungen des Herzmuskel (Jin *et al.* 1990, Saji *et al.* 2012). Auf die Coxsackievirus -induzierte Myokarditis soll im Folgenden näher eingegangen werden.

Die von Coxsackieviren induzierte virale Entzündung des Herzmuskels lässt sich in zwei Phasen einteilen. Phase 1 ist durch die Infektion der Herzmuskelzellen und die damit einhergehende virale Replikation, direkte Zerstörung der Zellen durch die Viren und beginnende Immunantwort geprägt (Chow *et al.* 1992). Durch die Produktion der viralen 2A-Protease wird das zelluläre Dystrophin zerstört. Dystrophin liegt in Herz- und Skelettmuskelzellen als Komplex mit einem Glykoprotein vor und dient der mechanischen Stabilisierung der Zelle, sowie der Signalübertragung zwischen Zytoskelett, Zellmembran und Extrazellularraum. Durch die Spaltung von Dystrophin wird die Zellmembran instabil und verliert ihre Integrität. Dies führt zum Zelluntergang und somit letztendlich zur Degeneration des Herzmuskels (Badorff *et al.* 1999, Lapidus *et al.* 2004). Während der akuten Infektion zeigt sich eine massive Infiltration von Zellen des angeborenen Immunsystems (Dendritische Zellen, Natürliche Killerzellen, Makrophagen, Monozyten). Nachdem T-Lymphozyten durch Antigen-präsentierenden Zellen aktiviert wurden, reichern sich CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen im Gewebe an (Abb. 3.1). CD8<sup>+</sup>-Zellen erkennen und eliminieren befallene kardiale Myozyten. (Luppi *et al.* 2001, Yajima 2011). Die eingewanderten Th1-Zellen sezernieren Interleukin 2 (IL-2) und Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) und stimulieren Makrophagen. Th2-Zellen setzen IL-4, IL-5 und IL13 frei. Diese Interleukine aktivieren B-Zellen und fördern somit die Antikörperproduktion. (Rose 2008, Seder *et al.* 1993).

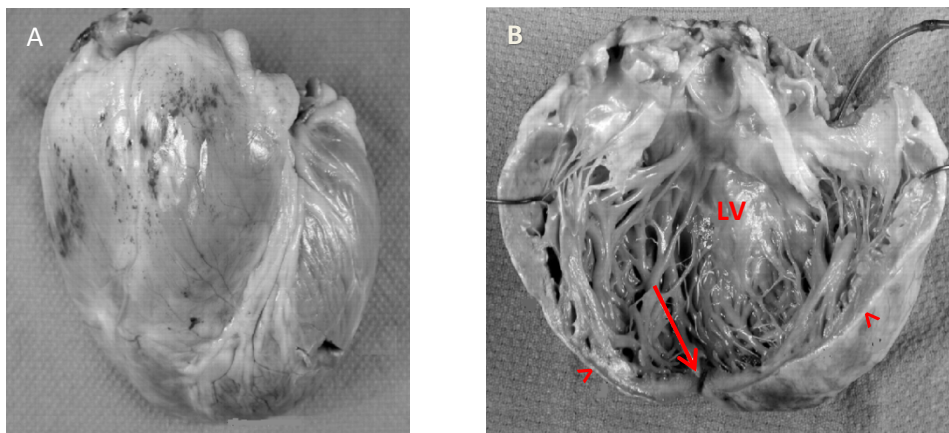


**Abb. 3.1: Akute Myokarditis mit Entzündungszell-Infiltraten.** Der Pfeil markiert Lymphozyten-Ansammlungen im Myokard; (verändert nach Muehlenbachs *et al.* 2014).

Die zweite Phase der Myokarditis ist geprägt durch eine Autoimmunreaktion gegen die kardialen Myozyten. Mehrere Faktoren könnten hierbei eine Rolle spielen. Durch die Replikation der Viren in den Herzmuskelzellen werden viele zelleigene Proteine hydrolysiert. Dies scheint sie so zu verändern, dass sie als „fremd“ erkannt werden und dadurch eine zytotoxische Immunantwort auslösen. Auch die Freisetzung einer Vielzahl zellulärer Proteinen aus nekrotischen Zellen wirkt als starker Stimulus auf T-Zellen (Pankuweit *et al.* 2002, Rose 2008, Whitton *et al.* 2005). Da sich einige virale und zelluläre Peptide sehr ähnlich sind, kommt es zu einer Kreuz-Aktivierung der T-Zellen. Sie werden nun nicht nur durch virale Antigene sondern auch durch ähnliche Selbst-Peptide angeregt. Dabei erkennen T-Zellen bestimmte Peptide des zellulären Myosins, die Epitopen von CVB3 sehr ähnlich sind (Bach 2005, Penninger *et al.* 1997, Prinz 2004). Neben T-Zellen können auch Antikörper autoreaktiv wirken. Im Blut betroffener Patienten konnten Autoantikörper gegen multiple molekulare Strukturen des Herzens nachgewiesen werden (u. a. Myosin, Aktin und Troponin I,  $\beta_1$ -adrenerge oder muskarinerge Rezeptoren, Sarkolemm) (Ansari *et al.* 1991, Caforio *et al.* 1992, Mascaro-Blanco *et al.* 2008). Die fortschreitende Myokarditis ist gekennzeichnet durch fibrotischen Ersatz der untergegangenen Myozyten. Die Zahl der Entzündungszellen ist dabei rückläufig. Auch lange nach Abklingen der Infektion kann jedoch in den Herzmuskelzellen virale RNA nachgewiesen werden. Die Replikation der Viren läuft zwar nur noch in abgeschwächter Form ab, führt aber dennoch zu linksventrikulärer Hypertrophie, Dilatation und verminderter systolischer Ejektionsfraktion. Aus der zunächst akuten Myokarditis wird eine DCM. Unter einer inflammatorischen viralen Kardiomyopathie wird eine Ventrikelerweiterung bei bestehender Entzündungsreaktion ( $<14$  Lymphozyten und Makrophagen/ $\text{mm}^2$  Myokard) verstanden. Dem Untergang von Herzmuskelzellen durch virale, immunregulatorische und autoimmune Prozesse ist der zunehmende bindegewebige Ersatz geschuldet. Dies geht mit dem Verlust der Kontraktionskraft und einer zunehmenden Erweiterung der Ventrikel einher (Abb. 3.2). Zunächst ist der linke Ventrikel betroffen, da hier der periphere Widerstand größer ist und sich ein Kontraktionsdefizit früher bemerkbar



macht. Die Patientinnen und Patienten sind lange Zeit symptomlos. Erst nach und nach treten Beschwerden wie Luftnot, Müdigkeit, Angina pectoris, Rhythmusstörungen und thrombembolische Ereignisse, hervorgerufen durch den verminderten Auswurf, bzw. die Hämostase in den dilatierten Ventrikeln, auf (Elliott 2000, Kawai 1999, Klingel *et al.* 1992, Luk *et al.* 2009, Pankuweit *et al.* 2004, Wessely *et al.* 1998).



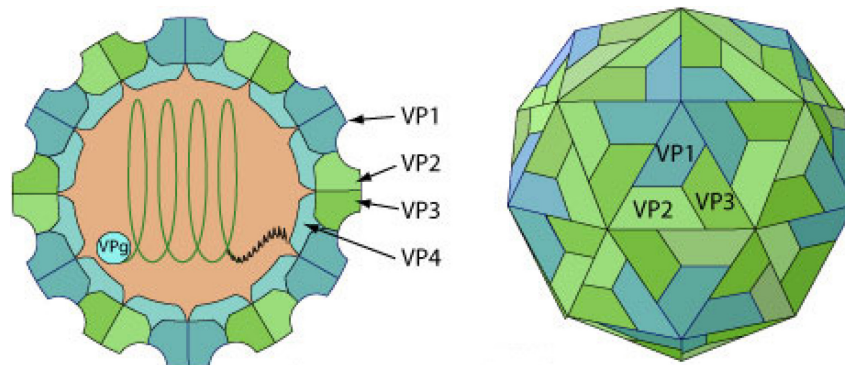
**Abb. 3.2: Dilatative Kardiomyopathie.** Teilabbildung A zeigt die starke Hypertrophie beider Ventrikel mit ausgeprägter Dilatation des linken Ventrikels und Verlust der physiologischen Herzgröße und -form. Teilabbildung B demonstriert bei eröffnetem linken Atrium und Ventrikel die deutliche Abrundung der Herzspitze (→) und die ballonartige Erweiterung des Ventrikels (LV). Die Wände des Myokards sind verdünnt (→); (verändert nach Luk *et al.*, 2009).

Als basisdiagnostische Methoden stehen die Echokardiographie zur Beurteilung der Ventrikeldilatation, EKG, Laboruntersuchungen, Koronarangiographie zum Ausschluss eines akuten Koronarsyndroms und ggf. nuklearmedizinische Verfahren zur Verfügung. Spezifischere Methoden sind jedoch der serologische Antikörperrnachweis, eine kardiale MRT sowie eine Endomyokardbiopsie. Dabei sind zusätzlich zu den konventionell histologischen Kriterien (Dallas-Kriterien) eine PCR und immunhistochemische Nachweise Goldstandard in der Diagnostik einer Myokarditis viraler Genese. Trotz allem ist die Diagnosestellung nicht immer sicher möglich, u. a., weil die Veränderungen im Myokard zunächst nur lokal begrenzt sind und so durch eine Biopsie ggf. nicht entdeckt werden (Andréoletti *et al.* 2009, Dettmeyer *et al.* 2006, Mangin *et al.* 2006). Die Behandlungsmöglichkeiten belaufen sich im klinischen Alltag in der Infektionsphase auf symptomatische Therapieansätze. In der wissenschaftlichen Erprobung befinden sich antivirale Substanzen, die die Aufnahme von Viren in die Zellen verhindern sollen (z. B. Peconaril), Replikations-Inhibitoren wie Ribavirin oder Interferone (Florea *et al.* 2003, Heim *et al.* 1997, Heim *et al.* 1996, Kishimoto *et al.* 1988, Pevear *et al.* 1999, Wang *et al.* 2007b). Im Stadium der Autoimmunreaktion gibt es

Befürworter einer immunsuppressiven Therapie (z. B. mit Cortikosteroiden und Calcineurininhibitoren wie Cyclosporin und Tacrolimus), um dem Fortschreiten der Myokarddestruktion Einhalt zu gebieten. Gegner dieser Behandlungsmethode führen an, dass Infektion und Autoimmunreaktion schleichend in einander übergehen und eine immunsuppressive Therapie somit eine Ausweitung der Infektion zur Folge haben könnte (Kawai 1999, Kleinert *et al.* 1997, Miyamoto *et al.* 2001, Wojnicz *et al.* 2001). Ist das Stadium der DCM erreicht, beschränken sich alle Therapiemaßnahmen auf eine Verbesserung der Symptome. So werden  $\beta$ -Blocker und AT-1-Rezeptor-Antagonisten zur Senkung des Blutdrucks, ACE-Hemmer zur Reduktion der Wandspannung, Diuretika bei übermäßiger Flüssigkeitsablagerung und Antikoagulantien bei Hämostasie gegeben. Diese Medikamente haben jedoch keine Auswirkung auf die Kardiomyopathie und können ein Fortschreiten der Erkrankung lediglich verzögern. In ersten klinischen Tests zeigten allerdings Therapieversuche mit Interferon- $\beta$  erfolgsversprechende Ergebnisse. So konnte die Viruslast vermindert und sogar ein Rückgang der ventrikulären Dilatation erzielt werden. Dennoch bleibt bis heute als letzte Maßnahme oft nur eine Herztransplantation (Mckelvie *et al.* 1999, Packer *et al.* 1996, Pietra *et al.* 2012, Pitt *et al.* 1999).

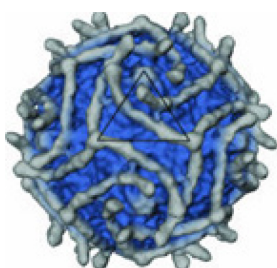
Das für diese schwerwiegende Erkrankung ursächliche Cocksackievirus ist nach dem Ort seiner Entdeckung 1947 nach der Kleinstadt Cocksackie (USA) benannt. Es gehört zur der Familie der Picornaviren und zur Gattung der Enteroviren. Den beiden Stämmen Cocksackievirus A und B werden die Serotypen A1-22 und 24, sowie B1-6 zugeordnet. Die Bezeichnung „**Picorna**“ steht für „**pico**“ (klein) und „**RNA**“, also für kleine Viren mit RNA-Genom (Hsiung und Wang 2000, Kayser *et al.* 2001). Vermutlich sind Cocksackieviren aus der Rekombination unterschiedlicher Enteroviren hervorgegangen (Modrow *et al.* 2010). Picornaviren besitzen ein einsträngiges, plus-Strang RNA-Genom, bestehend aus 7410 Basen, das als mRNA fungiert, die vor der Replikation nicht mehr abgeschrieben werden muss. Da also mittels viraler mRNA und zellulärer Enzyme unmittelbar virale Proteine hergestellt werden können, ist bereits die nackte RNA infektiös (Liu *et al.* 2013b, Scharl *et al.* 2009). Das Genom ist von einem ikosahedrischem Capsid umgeben. Es besteht aus vier Proteinen VP1, VP2, VP3 und VP4, wobei VP1 bis 3 die Außenseite des Capsids bilden und VP4 auf der Innenseite lokalisiert ist und Kontakt zur viralen RNA hat (Abb. 3.3). Das Capsid ist nicht von einer Hüllmembran (Envelope) umgeben (Muckelbauer *et al.* 1995). Dies bedeutet zum einen eine hohe Resistenz zum Beispiel gegenüber Alkohol und milden Detergenzien wie

etwa Seife und damit eine hohe Umweltpersistenz (Kayser *et al.* 2001). Zum anderen kann die Virushülle so nicht einfach mit der Zellmembran fusionieren. Die Interaktion zwischen Zelle und Virus muss folglich durch einen Rezeptor vermittelt werden (Freimuth *et al.* 2008). Wegen der ikosahedralen Form des Capsids ergeben sich Symmetrieachsen (Abb. 3.3), zwischen denen sich Einsenkungen, sogenannte Canyons, befinden (Muckelbauer *et al.* 1995). Jeder Canyon formt eine hydrophobe Tasche, die normalerweise mit einer 16 C-Atom langen Fettsäure („pocket factor“) ausgefüllt ist und so das Capsid stabilisiert (Hadfield *et al.* 1999).



**Abb. 3.3: Das Capsid des Cocksackievirus.** Es besteht aus den Virusproteinen 1 (blau), 2 (hellgrün), 3 (dunkelgrün) und 4 (hellblau), wobei VP4 auf der Innenseite liegt und Verbindung zum Genom hat. Durch die ikosahedrale Anordnung bilden sich Canyon-Strukturen aus; (Swiss Institute of Bioinformatics 2014).

Die häufigste Eintrittspforte von Cocksackieviren in den menschlichen Körper ist durch Mund und Nase, verbunden mit einer ersten Virusvermehrung im Rachenraum und Magen-Darm-Trakt. Obwohl die Epithelzellen des Magen-Darm-Traktes mittels tight junctions und polarer Glykokalyx als Barriere gegen Erreger dienen sollen, kann das Cocksackievirus sie zur Vermehrung und anschließend zum Übergang in das Blutssystem nutzen (Bozym *et al.* 2011). Dazu bindet es an den an der apikalen Zellseite gelegenen Rezeptor decay acceleration factor (DAF, CD55). Der Rezeptor legt sich über den Canyon und bindet in der Nähe des VP2 (Modrow *et al.* 2010, Riabi *et al.* 2014). Diese Interaktion führt zu einer Vernetzung von DAF-Molekülen, was wiederum eine Tyrosinkinase aktiviert (Abb. 3.4).



**Abb. 3.4: Vernetzte DAF-Moleküle (grau) bedecken ein Cocksackievirus (blau)** aus Hafenstein *et al.* 2007.

Der daraus resultierende Umbau des zellulären Aktinskeletts erlaubt es dem Virus, in die tight junction zwischen den Zellen vorzudringen. Dort befindet sich der Coxsackievirus- und Adenovirus-Rezeptor (CAR), welcher extrazellulär zwei Immunglobulin (Ig)-ähnliche Strukturen aufweist und zur Ig-Superfamilie gezählt wird. Eine besonders hohe Dichte dieses Rezeptors findet sich in den kardialen Myozyten, was den Kardiotropismus des Virus erklären könnte. Der DAF-Rezeptor scheint also als Co-Rezeptor für den CAR zu dienen (Inal und Jorfi 2013, Knowlton 2008, Yoder *et al.* 2012). Allerdings binden nur die Serotypen B1, B3 und B5 an den DAF-Rezeptor. Coxsackieviren der Serotypen A13, A18 und A21 nutzen ICAM als Co-Rezeptor und Serotyp A9 einen Vibronektinrezeptor (Modrow *et al.* 2010). Ihnen allen ist jedoch gemein, dass durch die Bindung am CAR der pocket factor disloziert und eine Konformationsänderung des Capsids hervorgerufen wird. Die Aufnahme des Virus erfolgt nun durch caveoläre Endozytose. Durch einen noch unbekannten Auslöser wird die virale RNA freigesetzt. Nach dem Prozess des Uncoatings bleibt die leere Capsidhülle zurück und die Translation der Virusproteine kann beginnen (Marsh und Helenius 2006, Shingler *et al.* 2013).

Die RNA der Coxsackieviren besitzt am 3'Ende eine Poly-A-Sequenz, weist am 5'Ende der RNA jedoch kein Cap auf, wie es bei eukaryoten Zellen der Fall ist. Stattdessen finden sich sowohl hier als auch am 3'Ende des Genoms nicht translatierte Regionen (5'NTR bzw. 3'NTR). Die 5'NTR besteht aus 6 stem loop-Strukturen, wobei die ersten 88 Basen eine für die Replikation wichtige kleeblattartige Sekundärstruktur ausbilden. Die stem loops 2 bis 6 beinhalten die IRES (internal ribosomal entry site). Sie ermöglicht eine Cap-unabhängige Translation des Virusgenoms. Am 5'Ende der RNA ist zudem ein virales genomassoziiertes Protein (VPg) kovalent gebunden (Chase und Semler 2012, Jang *et al.* 1988, Modrow *et al.* 2010). Damit bevorzugt die virale Translation ablaufen kann, wird der bei der eukaryotischen Translation notwendige Initiationsfaktor eIF-4F durch virale Proteasen gespalten. eIF-4F ist ein Komplex aus drei Faktoren (eIF-4A, eIF-4E und eIF-4G), wobei eIF-4E an die 5'Cap-Struktur der eukaryotischen RNA bindet. Die eigentlich stattfindende Interaktion zwischen eIF-4F, der eukaryotischen RNA und der, an einen weiteren Translations-Initiationsfaktor (eIF-3) gebundenen, kleinen 40S-Untereinheit des Ribosoms wird somit verhindert und die eukaryotische, Cap-vermittelte Translation gestoppt (virus-host shutoff). Die virale Translation kann durch die IRES jedoch problemlos ablaufen. Dazu binden die kleine 40S-Untereinheit des Ribosoms, die Initiator-tRNA und Initiations-Translationsfaktoren (eIF) als

Translationsinitiationskomplex an eine Basenfolge, die zur 18 rRNA des Ribosoms komplementär ist. Die Translation beginnt beim direkt darauf folgenden Basentriplett AUG in der IRES (Hellen und Sarnow 2001, Jang *et al.* 1990). Zunächst wird auf diese Weise ein langes Polyprotein synthetisiert (Abb. 3.5). Es enthält sowohl die Vorläufer der Strukturproteine als auch die der Nicht-Strukturproteine. Dabei dienen die Nicht-Strukturproteine 2A, 2B und 2C der Anpassung an die Stoffwechsellage der Wirtszelle. Da das Polyprotein mit dem aminoterminalen Ende beginnend fertig gestellt wird, wird nach den Capsidproteinen die Cysteinprotease 2A synthetisiert. Somit kann sie auch als erstes aktiviert werden und Struktur- von Nicht-Strukturproteinen spalten. Zelluläre Enzyme vollziehen die Myristylierung von 1A. Dieser Myristylrest bleibt auch im fertigen VP4 erhalten. Durch die autokatalytische Abspaltung von 3C und 3D entsteht eine weitere Protease (3CD<sub>pro</sub>). Diese Protease spielt eine entscheidende Rolle für die Spaltung der Virusproteine VP0, VP1 und VP3. Sie wird durch erneute Autolyse zu 3C und 3D hydrolysiert, wobei 3C enzymatische Aktivität besitzt und die Entstehung aller weiteren Proteine (2A, 2B, 2C, 3A, 3B) katalysiert. Die Protease 2A spaltet den zellulären Translations-Initiationsfaktor eIF-4F und verhindert so die zelluläre Translation zu Gunsten der viralen. Ebenso besitzt 3C proteolytische Eigenschaften. Durch eine nuclear localisation sequence (NLS) gelangt sie in den Zellkern und katalysiert dort u. a. den Abbau der RNA-Polymerase III, die zur Herstellung zellulärer tRNA nötig ist. Außerdem spaltet sie TATA-box bindende Proteine (TBP), Oktamer bindende Proteine (OCT-1) und cAMP responsive element bindende Proteine (CREB), die wichtige zelluläre Transkriptionsfaktoren sind. Die viralen Proteasen 2A und 3C verhindern ferner durch die Hydrolyse des zellulären Poly (A)-bindenden Proteins (PABP) an einer weiteren Stelle die Translation der zellulären Proteine. Weitere wichtige Funktionen kommen den Nicht-Strukturproteinen 3B und 3D zu. 3B stellt das VPg dar, das kovalent an das 5'Ende des viralen Genoms gebunden wird. 3D bildet die, in eukaryoten Zellen nicht vorhandene und deshalb vom Virus selbst synthetisierte, RNA-abhängige RNA Polymerase. Diese ist bei der Replikation des viralen Genoms von großer Bedeutung. Die Nicht-Strukturproteine 2B und 2C spielen möglicherweise eine Rolle bei der Bildung von Membrankomplexen. 3A dient der Uridinylierung von VPg. Erst im Zuge der Virusreifung wird durch die Interaktion mit dem viralen Genom in einem autokatalytischen Prozess VP0 zu VP4 und VP2 hydrolysiert, wobei VP4 den Kontakt zum Genom beibehält (Modrow *et al.* 2010, Tuthill *et al.* 2010, Whitton *et al.* 2005).



Sie werden für den retrograden Vesikeltransport vom Golgi Apparat zum ER bzw. zur Endozytose benötigt. Wird diese Interaktion zwischen Arf-1 und den Hüllproteinen durch das 3D Protein gestört, wird an Stelle von COP I und Clathrin vermehrt die Phosphatidylinositol-4-Kinase III  $\beta$  (PI-4-K III  $\beta$ ) in die Vesikel integriert. Ihre Aufgabe ist die Bildung von Phosphatidylinositol-4-Phosphat (PI-4-P). Durch die übermäßige Anreicherung von PI-4-K III  $\beta$  steigt der PI-4-P Gehalt in der Lipidschicht der Vesikel. Dies erleichtert wiederum die Bindung von Protein D, was einen weiteren Anstieg an PI-4-K III  $\beta$  und damit PI-4-P zur Folge hat. Durch dieses positive Feedback entsteht eine Dysbalance, die zur vollständigen Auflösung des Golgi Apparates führt. Dies bedeutet einen massiven Eingriff in das Transportsystem der Zelle. Die Möglichkeit, Zytokine freizusetzen und Antigene über MHC-Moleküle zu präsentieren, wird eingeschränkt, da dazu die Bildung von Vesikeln notwendig ist. Das Risiko einer frühen Detektion infizierter Zelle durch das Immunsystem wird so vermindert. Letztlich wird durch die Viroplasmabildung auch das Zytoskelett der Zelle beschädigt, was der leichten Virusfreisetzung dienlich ist (Hsu *et al.* 2010, Inal und Jorfi 2013, Netherton und Wileman 2011).

Wurden genug Protomere translatiert, beginnt die Zusammensetzung des neuen Capsids, das sogenannte self assembly. Fünf Protomere, jeweils bestehend aus VP0, VP1 und VP3, lagern sich zu einem Pentamer zusammen. 12 solcher Pentamere bilden das sogenannte Procapsid. Das Procapsid besteht aus der Capsidhülle ohne virales Genom. Zur Aufnahme der RNA in das Procapsid gibt es zwei unterschiedliche Theorien: Möglich wäre die Aufnahme durch eine Öffnung von außen in das fertige Procapsid. Oder aber das Procapsid wird direkt um die RNA herum gefaltet. Nun ist die Interaktion zwischen Genom und Virusproteinen des Capsids möglich, wodurch der VP2-Anteil des VP0 aktiviert und VP0 in VP4 und VP2 gespalten wird. VP2 wird in die Capsidhülle eingebaut, während VP4 im Inneren mit Kontakt zum Genom verbleibt (Curry *et al.* 1997, Jacobson *et al.* 1970, Phillips *et al.* 1968).

Für die effiziente Virusvermehrung ist einerseits wichtig, dass dem Virus genug Zeit zur Replikation bleibt, ohne dass das Immunsystem aktiviert wird oder die Wirtszelle zu Grunde geht. Auf der anderen Seite begünstigen Coxsackieviren die Apoptose, also den programmierten Zelltod der Wirtszelle, um die Freisetzung der reifen Viren zu beschleunigen (Zhou *et al.* 2009). Die Apoptose lässt sich in zwei unterschiedliche Mechanismen unterteilen. Der extrinsische Weg wird über externe Signale, beispielsweise über den Fas-Rezeptor auf

der Plasmamembran, ausgelöst. Bindet ein Ligand an den Rezeptor, werden seine intrazellulär gelegenen Todes-Domänen (death domains) aktiviert. Es erfolgt nun die Anregung der Caspase-8 (Caspase=Cysteiny-Aspartyl-Protease), die wiederum die Caspase-3 aktiviert. Caspase-3 stoppt die DNA-Reparatur, baut DNA, Zytoskelett und Kernlamina ab und bewirkt somit den Zelltod. Im Unterschied dazu wird beim intrinsischen Weg der Apoptose durch pro-apoptotische Faktoren (bax, bid) an der äußeren Mitochondrienmembran Cytochrom c aus dem Intermembranraum des Mitochondriums freigesetzt. Cytochrom c bewirkt die Aktivierung von Caspase-9. Diese Protease aktiviert wiederum Caspase-3 und initiiert so den Zelltod. Durch die Spaltung des Zytoskeletts und fokaler Kontakte verliert die Zelle ihre Form, rundet sich ab und löst sich aus dem Zellverband. Der fragmentierte Zellkern, Organellen und Zytoplasma bilden sogenannte apoptotische Körperchen und werden von umliegenden Zellen bzw. Phagozyten aufgenommen (Carthy *et al.* 1998, Chau *et al.* 2007, Müller-Esterl *et al.* 2009).

In der von Coxsackievirus befallenen Zelle sind die viralen Proteinasen 3C und 2A für die Aktivierung der Caspasen verantwortlich und leiten so die Apoptose der Wirtszelle ein. Des Weiteren wird der extrinsische Weg der Apoptose über CD27, einen Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor an der Außenseite der Plasmamembran eingeschlagen. CD27 wird durch CD70 aktiviert und besitzt über das intrazellulär gebundene Protein Siva death domains. In virusinfizierten Zellen bindet VP2 an die death domains von Siva und löst auch ohne die Bindung von CD70 den apoptotischen Vorgang aus (Henke *et al.* 2000). Neben der Aktivierung der Caspasen sind die viralen Proteasen 3C und 2A auch eigenständig verantwortlich für die Spaltung des Zytoskeletts. 3C hydrolysiert z. B. Mikrotubuli-assoziierte Faktoren. Mikrotubuli stabilisieren die Zelle und dienen als intrazelluläres Transportsystem. 2A zerstört Zytokeratin und Dystrophin. Zytokeratine sind ebenfalls Teile des Skeletts der Zelle, während Dystrophin im Sarkolemm von Muskelzellen vorkommt. Der Spaltung dieses Strukturproteins kommt eine besondere Bedeutung bei der Entstehung der dilatativen Kardiomyopathie durch Coxsackieviren zu (Carthy *et al.* 1998, Tuthill *et al.* 2010). Auch ist seine Funktionsunfähigkeit für den zytopathischen Effekt (CPE) in Zellkulturen verantwortlich. Neben dem extrinsischen Weg spielt aber auch der intrinsische eine wichtige Rolle bei der Apoptose der Wirtszelle. Das virale Nicht-Strukturprotein 2B besitzt die Fähigkeit, Multimere zu bilden und dank einer hydrophilen und einer hydrophoben Domäne Poren in Membranen zu erzeugen.



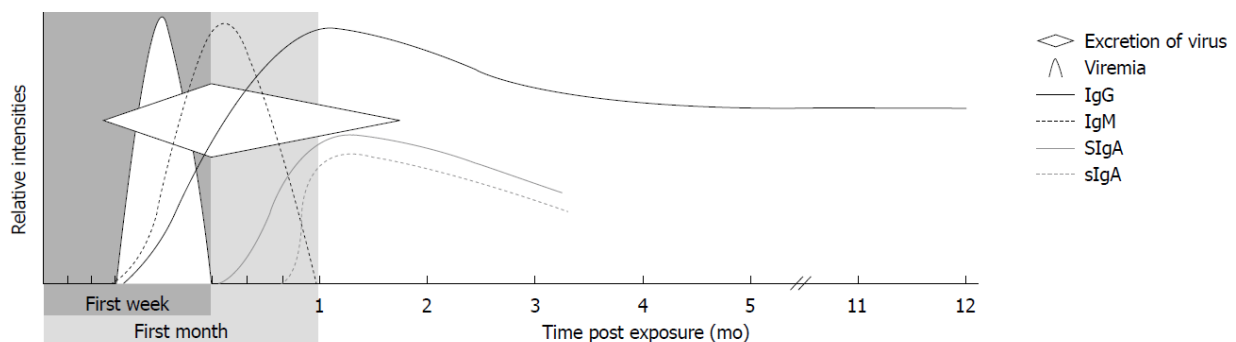
Diese Multimere werden Viroporine genannt (van Kuppeveld *et al.*, 1997, Nieva *et al.*, 2003). Durch die entstandenen Poren in ER und Golgi kommt es zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux. So reichert sich  $\text{Ca}^{2+}$  im Intrazellularraum und den Mitochondrien an. Dadurch wird das Membranpotential verändert, was zur Öffnung von spannungsgesteuerten Ionenkanälen in der äußeren Mitochondrienmembran führt. Der konsekutive Cytochrom c-Ausstrom wirkt als Stimulus für den intrinsischen Weg (Zhou *et al.* 2009). Dieser kann zudem durch die Aktivierung der pro-apoptotischen Faktoren bax und bid ablaufen. Sie werden durch 3C aktiviert (Chau *et al.* 2007, Zhou *et al.* 2009).

Würde in einer Wirtszelle direkt nach der Infektion mit Coxsackieviren Apoptose induziert werden, hätten die Viren nicht ausreichend Zeit zur Vermehrung. Um das zu verhindern, werden verschiedene Strategien verfolgt. Zum einen dauert die Anreicherung von  $\text{Ca}^{2+}$ , die zur Cytochromfreisetzung führt, ca. sechs Stunden; Zeit, die zur Replikation genutzt werden kann. Zum anderen exprimieren Mitochondrien die anti-apoptotischen Faktoren Bcl-2 und Bcl-xL, die die pro-apoptotischen Faktoren neutralisieren und die äußere Mitochondrienmembran stabilisieren (Chau *et al.* 2007). Ferner wird durch Coxsackieviren ein zellerhaltender Prozess, die Autophagie, unterstützt. Dabei vernichtet die Zelle eigene Zellbestandteile, die Zellintegrität bleibt jedoch erhalten. In diesem Kontext spielt die Cystein-Protease Calpain eine wichtige Rolle. Calpain fördert autophagische Prozesse und behindert die Caspase-3 Aktivität und damit auf unmittelbarem Weg die Apoptose. Zu Beginn der Infektion wird durch die Porenbildung in ER und Golgi in den Signalweg zwischen ER, Golgi und Mitochondrien eingegriffen. Der physiologische  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel in den Mitochondrien nimmt ohne diese Kontrolle ab und die Cytochrom c-Freisetzung wird unterdrückt (Campanella *et al.* 2004, Li *et al.* 2014, Xin *et al.* 2014). Durch diese Mechanismen soll ein vorzeitiger Zelluntergang vermieden und eine erfolgreiche Virusvermehrung gewährleistet werden. Für eine wirksame Freisetzung der Virionen muss die Balance zwischen pro- und anti-apoptotischen Stimuli in weiteren Verlauf der Infektion aber zu Gunsten der Apoptose ausfallen. Durch die steigende Anzahl an fertigen Viren nimmt auch die Zahl der Proteasen und damit die direkte Aktivierung der Caspasen und die Zerstörung des Zytoskeletts zu. Auch spaltet Caspase-3 Autophagie-induzierende Faktoren wie autophagy related genes (Atg) oder Beclin-3 (Xin *et al.* 2014). Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch Porenbildung nimmt zu und durch das destabilisierte Membranpotential auch die Membranpermeabilität. Auch Calpain wird durch den anhalten hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Stimulus vom

zellprotektiven zum apoptotischen Faktor, indem es das Aktin des Zytoskeletts depolymerisiert. Durch die auf vielen Ebenen zerstörte Membranintegrität können relativ große, mit Viren beladene Mikrovesikel (0,1 µm-1 µm) abgeschnürt werden. Diese Vesikel dienen normalerweise vermutlich der Zell-Zell-Kommunikation, werden hier aber als „Virus-Fähren“ genutzt und führen so zu einer raschen Infektion der benachbarten Zellen (Inal und Jorfi 2013, Ratajczak *et al.* 2006, Robinson *et al.* 2014). Schlussendlich gibt es noch eine weitere Möglichkeit der Virusverbreitung: Durch Aktin-Rearrangierung entstehen Protusionen; kleine Ausstülpungen der Zelle. Diese Protusionen stehen in engem Kontakt zur Nachbarzelle und ermöglichen eine Ausbreitung der Erreger noch bevor die Wirtszelle apoptotisch wird (Paloheimo *et al.* 2011).

Das Immunsystem des Körpers bietet der Vermehrung und Verbreitung der Viren Einhalt. Dabei wird zunächst das angeborene, unspezifische Immunsystem aktiviert. Es reagiert nicht auf ein spezifisches Antigen, sondern auf Pattern-associated-molecular-pattern (PAMPs). Dendritische Zellen, Monozyten und Makrophagen erkennen PAMPs über ihre pattern recognition Rezeptoren (PRR). Eine Gruppe der PRR, die toll-like Rezeptoren (TLR), binden beispielsweise an virale RNA. Dies können Einzelstrang-RNA (gebunden von TLR 3) oder, als Intermediat bei der Replikation anfallende, RNA-Doppelstränge (gebunden von TLR 7 und 8) sein. Nach der Phagozytose der als infiziert erkannten Zellen präsentieren die Phagozyten Erregerfragmente über MHC II Moleküle auf ihrer Zelloberfläche. Zudem produzieren sie Interferon und chemotaktisch wirksame Zytokine (u. a. IL-8). So werden weitere Zellen des angeborenen Immunsystems aktiviert, die wiederum weitere Zytokine produzieren (Leukotriene, Prostaglandine, IL-6, IL-8, TNF-α) (Anagandula *et al.* 2013, Kawai und Akira 2007, Knowlton 2008, Wang *et al.* 2007a). Ferner wird die Differenzierung der T-Zellen zu Th 1- und Th 2-Zellen und von naiven B-Zellen zu Antikörper sezernierenden B-Zellen sowie die Aktivierung von T-Killerzellen eingeleitet. Mit diesem Schritt beginnt das erworbene Immunsystem zur Bekämpfung der Infektion beizutragen. Doch nicht nur Immunzellen sondern auch infizierte Zellen produzieren Zytokine, um die antiviralen Schutzmechanismen ihrer Nachbarzellen zu verstärken. Dabei interagieren zytosolische Rezeptoren (RIG-1 und MDA-5), TLR 3 und virale RNA. Dieser Komplex aktiviert IKKε und TBK1-Kinasen, welche den interferon regulatroy factor (IRF-3) phosphorylieren und damit aktivieren. Dieser Transkriptionsfaktor sorgt als Dimer im Zellkern für die Transkription von Interferon-β. Interferon-β fördert in den Nachbarzellen die Expression Interferon-stimulierter Gene

(Alexopoulou *et al.* 2001, Reikine *et al.* 2014). Eine besondere Rolle bei der Bekämpfung einer Coxsackievirus-Infektion kommt den B-Zellen und den Antikörpern zu. Sie sind wichtig, um die Verbreitung der Viren einzuschränken und bei einer Reinfektion schnell reagieren zu können. Viren können durch Antikörper neutralisiert werden, indem diese mit ihrem Fab-Teil an antigenen Stellen auf Capsid-proteinen (VP1, VP1 + VP2, VP1 + VP3) binden (Halim und Ramsingh 2000, Reimann *et al.* 1991). Ferner erschweren Antikörper die Bindung von Viren an zellulären Rezeptoren, behindern das Uncoating, indem sie an strukturelle Untereinheiten binden und markieren die Viren für Phagozyten. Auch das Komplementsystem wird durch die Antigen-Antikörper-Komplexe aktiviert, das infizierte Zellen für die Phagozytose markiert und lysiert. Die Produktion von IgM beginnt nach 3-5 Tagen (Abb. 3.6). IgG ist ca. 4 Tage p. i. nachweisbar und kann noch Jahre nach der Infektion im Blut zirkulieren. Mit abnehmendem IgM-Titer steigt auch der IgA Titer und bleibt bis ca. 3 Monate p. i. bestehen (Dotzauer und Kraemer 2012, Modlin und Bowman 1987).



**Abb. 3.6: Viruslast und Antikörpertiter im zeitlichen Verlauf einer Infektion mit Coxsackieviren.** Virus wird ca. 2 Tage p. i. bis ca. 2 Monate p. i. ausgeschieden. Die Virämie beginnt 3 Tage p. i., erreicht nach 5 Tagen ihren Höhepunkt und ist nach 7 Tagen abgeklungen. IgM ist als erster Antikörper nach 3 Tagen nachweisbar und nimmt bis zum Ende des 1. Monats p. i. ab. Ein IgG-Titer lässt sich ab ca. Tag 4 p. i. nachweisen und bleibt über Jahre nach der Infektion bestehen. Sekretorisches IgA (SIgA) steigt 7 Tage nach infektionsbeginn an, Serum-IgA (sIgA) erst nach 3 Wochen. Beide Spiegel bleiben bis 3 Monate p. i. erhöht (aus Dotzauer und Kraemer 2012).

Dank der effizienten Immunabwehr verlaufen Infektionen mit Coxsackieviren meist symptomlos oder in Form einer gewöhnlichen Erkältung. Abhängig vom Serotyp können aber auch schwerwiegende Krankheiten in Erscheinung treten. Grundsätzlich lässt sich sagen, dass Viren der Serotypen A1-A22 und A24 für Infektionen der Haut und Schleimhäute verantwortlich sind. Viren der Serotypen B1-B6 befallen dagegen eher innere Organe wie Lunge, Herz, Leber und Pankreas. Die Serotypen A6, A10 und A16 sind zusammen mit Enterovirus 71 verantwortlich für die Hand-Fuß-Mund-Krankheit, von der zumeist Kinder

betroffen sind. Die durch Coxsackievirus A6 ausgelöste Form nimmt vor allem im asiatischen Raum rapide zu (He *et al.* 2013). Charakteristisch sind Erkältungssymptome und ein makulo-papulöser Ausschlag an Hand- und Fußflächen, sowie in der Mundhöhle. (Muehlenbachs *et al.* 2014, Repass *et al.* 2014, Stock 2014).

Die Serotypen A4, A5 und A6 können eine Herpangina hervorrufen, auch diese tritt gehäuft bei kleinen Kindern auf. Dabei zeigen sich neben Erkältungssymptomen auf der Schleimhaut in Mundhöhle und Rachenraum sowie teilweise auf den Tonsillen charakteristische weißliche Bläschen mit rotem Hof oder flache Ulzerationen (Zavate *et al.* 1984).

Akute hämorrhagische Konjunktivitis wird durch Coxsackievirus A24 hervorgerufen. In seltenen Fällen kann es zu einer neuronalen Mitbeteiligung kommen. In der Regel heilt die Entzündung jedoch nach einigen Tagen von selbst aus (Lim *et al.* 2014).

Die von den Serotypen der Gruppe B verursachten Krankheiten sind ungleich schwerwiegender. Sie können beispielsweise Infektionen des ZNS auslösen und in der Folge eine aseptische Meningitis oder nekrotisierende Meningoenzephalitis. Dabei ist die Meningoenzephalitis seltener, zeigt aber oft einen schwereren Verlauf. Beide Formen können zu bleibenden neuronalen Defiziten oder gar zum Tod führen (Marques *et al.* 2014). Besonders Kinder im Alter von 5-15 Jahren sind davon betroffen, da in der Entwicklung befindliche neuronale Stammzellen eine hohe Dichte an CAR aufweisen und so für Coxsackieviren besonders empfänglich sind. Zudem wird die Infektion durch wandernde Neuronen weiter getragen. Die infizierten Neuronen werden erst nach ihrer Ausdifferenzierung apoptotisch und hinterlassen so Defekte im Gehirnparenchym (Feuer *et al.* 2003, Rotbart 1995). Die für die Virenabwehr wichtige IFN-Produktion ist in Neuronen nur eingeschränkt möglich, da IFN im ZNS toxisch wirkt. Histologisch zeigt sich eine Infiltration mit Lymphozyten und Neutrophilen Granulozyten, sowie Mikroglia-Ansammlungen. Ferner ist der ausgeprägte virusinduzierte Untergang von Neuronen auffällig (Muehlenbachs *et al.* 2014).

Auch für die Entstehung einer akuten Pankreatitis zeichnen Coxsackieviren der Gruppe B verantwortlich. 14,8% aller Pankreatitiden gehen auf eine Enterovirus-Infektion zurück. Dabei spielen vor allem CVB2, 3, 4 und 5 eine Rolle. Zum einen gehen Pankreaszellen direkt durch virusvermittelte Lyse unter. Zum anderen kommt es vermutlich durch die oft lange Persistenz von viraler RNA in den  $\beta$ -Zellen der Langerhans'schen Inseln zu einer Autoimmunreaktion. Die gebildeten Auto-Antikörper zerstören die Insulin produzierenden

Zellen. Aus diesem Grund wird davon ausgegangen, dass eine Coxsackievirus-Infektion eine Ursache für die Entstehung von Typ I Diabetes sein könnte (Arnesjo *et al.* 1976, Clements *et al.* 1995, und Friman 1993, Jaidane und Hober 2008).

Auch die Lunge kann von einer Coxsackievirus-Infektion betroffen sein. Die Entzündung von Brust- und Bauchmuskulatur sowie Pleura äußert sich in starken, atmungsabhängigen, stechenden Schmerzen. Dies wird Pleurodynie oder Morbus Bornholm genannt und kann sich auf das umliegende Gewebe ausbreiten. In der Lunge zeigen sich histologisch interstitielle Ödeme und eine massive Infiltration von Entzündungszellen (Huang *et al.* 2010, Lazarus *et al.* 1952, Muehlenbachs *et al.* 2014).

Schließlich ist noch der Befall der Leber zu nennen. Auch hier sind Coxsackieviren der Gruppe B die Auslöser einer fulminanten Hepatitis, die besonders bei Neugeborenen tödlich verlaufen kann. Dabei manifestiert sich eine Infektion vor allem in der frühen Phase in der Leber und wird unter dem Mikroskop durch einen massiven Untergang von Hepatozyten deutlich. Auch hier reichern sich pro-inflammatorische Zellen des Immunsystems im Leberparenchym an. Die Entzündung schreitet vor allem im jungen Kindesalter rasch voran und führt unter anderem zu Ikterus und Koagulopathie (Konen *et al.* 2000, Lind *et al.* 2014, Liu *et al.* 2013a, Wang *et al.* 1998).

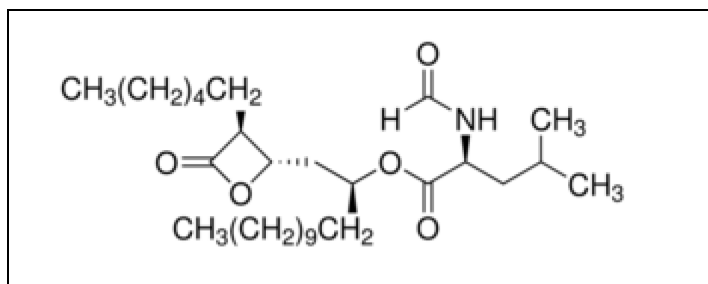
Besondere klinische Relevanz hat jedoch die eingangs beschriebene Myokarditis. Vor dem Hintergrund der Schwere der Krankheit und ihrem potentiell letalen Verlauf kommt der Erforschung (neuer) therapeutischer Ansätze besonderes Gewicht zu. Von großem Interesse ist hierbei die möglichst frühzeitige Therapie der Infektion mit Coxsackievirus B3 (CVB3), um so die Entstehung einer fulminanten Myokarditis mit potentieller Progression zur DCM zu verhindern. Wie bereits erwähnt, wurde eine Vielzahl von Substanzen untersucht, die an unterschiedlichen Stellen der Virusvermehrung ansetzen und diese unterbinden sollen. Mittels kleiner Moleküle, die sich in die hydrophobe Tasche des Canyons im Viruscapsid lagern, kann die Adhäsion der Viren an den zellulären Rezeptor unterbunden werden (Smith *et al.* 1986). Den gleichen Effekt haben sogenannte Soluble Rezeptors Analogues, die an das Virus binden, bevor es mit dem zellulären Rezeptor interagieren kann, und so die Penetration des Virus in die Zelle verhindern (Dorner *et al.* 2004). Eine andere Möglichkeit besteht in der Inhibition der Virus-Replikation. Dies ist durch NO-Donatoren, die die Aktivität der viralen Proteasen 2A und 3C inhibieren, oder durch Nukleosid-Analoga, die zu

Mutationen in der viralen RNA führen, möglich (Heim *et al.* 1997, Saura *et al.* 1999). Eine Unterbindung der Ubiquitinylierung durch die Zelle inhibiert die virale Replikation (Si *et al.* 2008). Auch die Interferenz von kleinen RNA-Abschnitten mit dem viralen Genom und Anlagerung von Antisens-Nukleotiden kann die Virusreplikation hemmen (Grunweller *et al.* 2003, Kurreck 2003). All diese Ansätze haben sich aber entweder in klinischen Tests nicht bewährt oder bedürfen noch weiterer Erforschung und Überarbeitung.

Ein weiterer Angriffspunkt wurde dabei bisher kaum beachtet: Die Möglichkeit, den für die Virusreplikation notwendigen zellulären Stoffwechsel zu beeinflussen und so womöglich die Virusvermehrung zu drosseln. Die Bildung von Viroplasmen in der Wirtszelle, die von Coxsackieviren zur Replikation genutzt werden, stellt einen Eingriff in den zellulären Stoffwechsel dar und erhöht den Bedarf an Fettsäuren (Netherton und Wileman 2011). Ein neuer Ansatz wäre folglich, das Fettsäureangebot in einem für die Zellen unschädlichen Maß zu minimieren und so möglicherweise die Virusreplikation zu hemmen (Wilsky *et al.* 2011). Die Zelle kann auf zwei Wegen Fettsäuren gewinnen: Zum einen durch Synthese im Zytosol, zum anderen durch Aufnahme aus dem Extrazellularraum. Die Synthese beginnt mit der Aktivierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA durch die Acetyl-CoA-Carboxylase. Die weitere Synthese wird an einem Multienzymkomplex, bestehend aus zwei Untereinheiten mit je sechs katalytischen Zentren, vollzogen. Die zentral gelegenen acyl carrier protein (ACP)-Domänen werden mit Acetylresten beladen, welche für die folgenden Reaktionsschritte von einem katalytischen Zentrum des Komplexes zum nächsten befördert werden. Der an ACP gebundene Acetylrest wird am nächsten Enzym, dem condensing enzyme, mit dem Malonyl-Rest verestert. Die entstandene Acetoacetylgruppe bleibt an ACP gebunden. Im nächsten Schritt wird an der zweiten Untereinheit eine Carbonylgruppe der Verbindung durch die  $\beta$ -Ketoacyl-Reduktase zu einer Hydroxylgruppe reduziert. Durch die Abspaltung von Wasser entsteht eine Doppelbindung in trans Konformation zwischen C2 und C3. Der so entstandene Butyrylrest kann nun erneut auf das condensing enzyme übertragen werden und ein neuer Synthesekreislauf beginnen. Eine maximal 16 C-Atome lange Fettsäure kann am Multienzymkomplex synthetisiert werden. Sie wird durch eine Thioesterase von ACP getrennt und als Palmitinsäure freigesetzt. Längere Fettsäuren und ungesättigte Fettsäuren werden an der zytosolischen Seite des ER weiter modifiziert. Durch Malonyl-CoA wird die Fettsäure um zwei C-Atome verlängert. Durch selektive Dehydrierungen entstehen aus Einfach- Doppelbindungen und damit aus gesättigten

ungesättigte Fettsäuren. Aus den generierten Fettsäuren stellt der Körper Hormone, wie Prostaglandine und Thromboxan, her oder verändert sie weiter zu Membranlipiden (Phosphoglyceride und Sphingolipide) (Müller-Esterl *et al.* 2009, Scharl *et al.* 2009, Stryer 1985). Neben der Synthese hat die Zelle die Möglichkeit, Fettsäuren aus dem Extrazellularraum aufzunehmen. Fettsäuren können als einzelne Moleküle oder aber in Kombination mit Proteinen als sogenannte Lipoproteine importiert werden. Einzelne Fettsäuren werden über Fettsäuretransportproteine in die Plasmamembran integriert und dann durch Flippasen von der außengelegenen Seite der Doppelmembran unter ATP-Verbrauch auf die zytosolische Seite transportiert. Mit Hilfe von Fettsäurebindungsproteinen gelangen sie aus der Membran ins Zytosol der Zelle. In Verbindung mit Proteinen werden Fettsäuren in Form von sogenannten Chylomikronen transportiert. Sie liegen dabei als Triglyceride vor. Diese Transportvesikel weisen auf ihrer Oberfläche Apolipoprotein E und C auf, die den Transport zu Fettzellen, Skelettmuskelzellen-, sowie Herzmuskelzellen vermitteln. Die Aufnahme in die Zelle erfolgt als Vesikel. Durch die Lipoproteinlipase können die als Triglyceride zu freien Fettsäuren gespalten werden und stehen nun der Zelle zur Verfügung (Müller-Esterl *et al.* 2009, Scharl *et al.* 2009, Stryer 1985).

Durch die Hemmung der Fettsäuresynthese und -Aufnahme in virusinfizierten Zellen sollte deren Einfluss auf die Virusreplikation untersucht werden. Dazu wurden die Substanzen Orlistat bzw. Phloretin verwendet.



**Abb. 3.7: Strukturformel Orlistat;** Sigma-Aldrich 2015b.

Orlistat ist ein chemisch hergestelltes Derivat von Lipstatin, einem natürlich vorkommenden Lipase-Inhibitor, der von *Streptomyces toxytricini* hergestellt wird (Ballinger und Peikin 2002). Es wurde bisher vornehmlich zur Unterstützung der

Gewichtsreduktion bei adipösen Patienten eingesetzt. Orlistat hemmt die gastrointestinale Lipase und vermindert so die Aufnahme von Fettsäuren aus der Nahrung. Für dieses Einsatzgebiet ist es auf dem amerikanischen und europäischen Markt zugelassen (European Medicines Agency 2016, U.S. Food and Drug Administration 2016). Zudem konnte jedoch auch eine Inhibition der Fettsäuresynthese festgestellt werden. Orlistat blockiert die Thioester-Domäne der Fettsäuresynthase, die zur Freisetzung der fertigen Fettsäuren nötig

ist. Dies erwies sich als relevant für die Tumorthherapie, da rasch proliferierenden Krebszellen vermehrt Fettsäuresynthase exprimieren und durch eine Hemmung der Fettsäuresynthase das Wachstum der Tumorzellen zum Stillstand gebracht werden konnte (Ballinger und Peikin 2002, Kridel *et al.* 2004, Menendez *et al.* 2005). Mittels anderer Substanzen (Cerulenin, C75 und Amentoflavon) wurde die Fettsäuresynthase bereits gehemmt und der Einfluss auf die Virusreplikation bestimmt (Rassmann *et al.* 2007, Wilsky *et al.* 2011).

Um die Fettsäureaufnahme aus dem Extrazellularraum zu inhibieren, wurde Phloretin verwendet. Phloretin lagert sich in biologische Membranen ein. Durch die entgegengesetzte Richtung der Dipole von Phloretin und der der umgebenden Fettsäuren beeinflusst es die Ladung, Fluidität und Permeabilität der Membran. Ferner inhibiert Phloretin Carrier-vermittelten Fettsäureimport und den Glukose-2-Transporter, der in Zellen des Dünndarms, der Leber, der Nieren und des Pankreas exprimiert wird. Möglicherweise durch die Kombination aus unterbundenem Glukosestoffwechsel und veränderter Membranpermeabilität kann Phloretin apoptotische Prozesse in Zellen induzieren. Da in rasch proliferierenden Zellen mehr Phloretin aufgenommen wird, wurde die Verwendung als Tumortherapeutikum geprüft (Nelson und Falk 1993). Weitere Untersuchungen evaluieren die Funktion als Penetrationsbeschleuniger für lipophile Medikamente, die auf der Haut aufgetragen werden. Phloretin interferiert zudem mit dem transmembranären Transport und schränkt auf diese Weise die Lipidaufnahme in die Zelle ein. (Abumrad *et al.* 1981, Andersen *et al.* 1976, Auner *et al.* 2005, Park *et al.* 2007, Wu *et al.* 2009).

Die beiden Substanzen greifen also an unterschiedlichen Ansatzpunkten hemmend in den zellulären Fettstoffwechsel ein. Die Senkung des Fettsäureangebots der Wirtszelle zur Reduktion der viralen Replikation ist ein bisher wenig beachteter interessanter Ansatzpunkt zur Therapie der viralen Myokarditis und war Grundlage der durchgeführten Untersuchungen mit Phloretin und Orlistat.



## 4 Zielstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Fettsäurestoffwechsel von Wirtszellen zu hemmen und den Einfluss auf die Replikation von CVB3 zu untersuchen. Neben einer Vielzahl in der Forschung befindlicher Therapieansätze zur Behandlung einer CVB3-Infektion stellt der Eingriff in den Fettstoffwechsel eine weitere, weitgehend unerforschte, Alternative dar. CVB3 benötigt zur Vermehrung sogenannte Viroplasmen. Diese bestehen aus zellulären Fettsäuren bzw. Membranteilen und bilden einen geschützten Raum, in dem die virale Replikation ungestört ablaufen kann. Für die Synthese der Viroplasmen steigt der Fettsäurebedarf der infizierten Zelle. Durch Eingriffe in den Fettsäurestoffwechsel ist eine gestörte Viroplasmenbildung und damit eine reduzierte Virusvermehrung zu erwarten.

Zum einen kann über die Hemmung der Fettsäureneusynthese in den zellulären Stoffwechsel eingegriffen werden. Zum anderen besteht die Möglichkeit, den Import von freien Fettsäuren aus dem Extrazellularraum zu inhibieren.

Um den Einfluss dieser Ansätze auf die CVB3-Replikationsrate zu charakterisieren, galt es folgende Fragen zu untersuchen:

- Wie beeinflusst ein gehemmter Fettsäurestoffwechsel der Wirtszelle die Replikation von CVB3?
- Kann ein Einfluss auf die Viroplasmenbildung nachgewiesen werden?
- Zeigt sich ein Unterschied hinsichtlich der Wirksamkeit zwischen den verwendeten Substanzen?
- Ist die Wirkung konzentrationsabhängig?
- Über welchen Zeitraum ist eine Wirkung nachweisbar?

## **5 Material und Methoden**

### **5.1 Zellkultivierung**

Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden Green-Monkey-Kidney-Cells (GMK-Zellen) verwendet. Es handelt sich hierbei um Nierenzellen der afrikanischen Meerkatze, die ein adhärentes Monolayer mit epitheliale Wachstumsmuster bilden. Sie eignen sich besonders gut zur Isolation und Vermehrung von Coxsackieviren (Menegus und Hollick 1982). Die Zellen wurden im Inkubationsschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5%-iger CO<sub>2</sub> Begasung kultiviert. Die Zellkulturflaschen („Cell Star“ 75cm<sup>2</sup>, von Greiner bio-one) enthielten 25 ml Nährmedium Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) mit 10% fetalem Kälberserum und 0,075% NaHCO<sub>3</sub> + 100 U/ml Penicillin + 100µg/ml Streptomycin (Lonza Bio Whittaker). Alle Arbeiten fanden in einer sterilen Werkbank statt.

### **5.2 Ablösen und Passagieren der Zellen**

Um die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen, wurde das Nährmedium entfernt und durch 5 ml Trypsin (0,4% + 0,1% Chelaplex III + 100U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin in PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; ph 7,4)) ersetzt. Nach 5 Minuten wurde das Trypsin so weit abgegossen, dass der Zellrasen gerade noch vollständig befeuchtet blieb. Nach 25 Minuten Inkubation bei 37°C wurden die Zellen durch vorsichtiges Beklopfen der Flasche vom Boden gelöst und die Trypsinreaktion durch Zugabe von 5 ml DMEM + 10% FKS gestoppt. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Pipettieren vereinzelt. Durch Zugabe von neuem Nährmedium wurden die Zellen aufgenommen und bei Bedarf neu ausgesät.

### **5.3 Bestimmung der Zellzahl und Infektion**

Vor Infektion der Zellen wurde die Zellzahl bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit Trypsin vom Boden abgelöst und in Medium (+ 10% FKS) suspendiert. 10 µl der Lösung wurden auf eine Neubauer Zählkammer aufgebracht und unter dem Lichtmikroskop (Lichtmikroskop Televal; Zeiss Jena) ausgezählt. In der Folge konnte so die „multiplicity of infection“ (MOI) ermittelt werden. Sie entspricht dem Vielfachen der Zellzahl an infektiösen Einheiten in der Viruslösung. Für eine MOI 10 ist dies das 10-fache der Zellzahl. Nach erfolgtem Mediumwechsel wurde das ermittelte Volumen an Infektionslösung appliziert und die Zellen entsprechend des Versuchsaufbaus inkubiert.

## 5.4 Verwendete Virusstämme

Es wurden folgende Coxsackieviren des Stamms „Nancy“ verwendet:

- Variante Woodruff (CVB3H3) (Titer  $1,58 \times 10^9/\text{ml}$ )
- Variante Woodruff/Kandolf (CVB3H3-EGFP) /Titer  $2,04 \times 10^8/\text{ml}$ )

## 5.5 Zytotoxizitätstest mittels WST-1

Kultivierte GMK-Zellen wurden nach oben beschriebenen Verfahren resuspendiert und in einer 96 Well-Platte 100  $\mu\text{l}$  Zellsuspension pro Vertiefung vorgelegt. Nach zwei Tagen Inkubationszeit bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> wurde das Medium vorsichtig entfernt und nach unten stehendem Schema (Abb. 5.1) durch 100  $\mu\text{l}$  Orlistat (Merck) ersetzt. Aus einer Stammlösung von 30 mM Orlistat in Dimethylsulfoxid (DMSO) wurden dazu in je 500  $\mu\text{l}$  Medium die Verdünnungen 10  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$ , 120  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$ , 170  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 360  $\mu\text{M}$  und 720  $\mu\text{M}$  hergestellt.

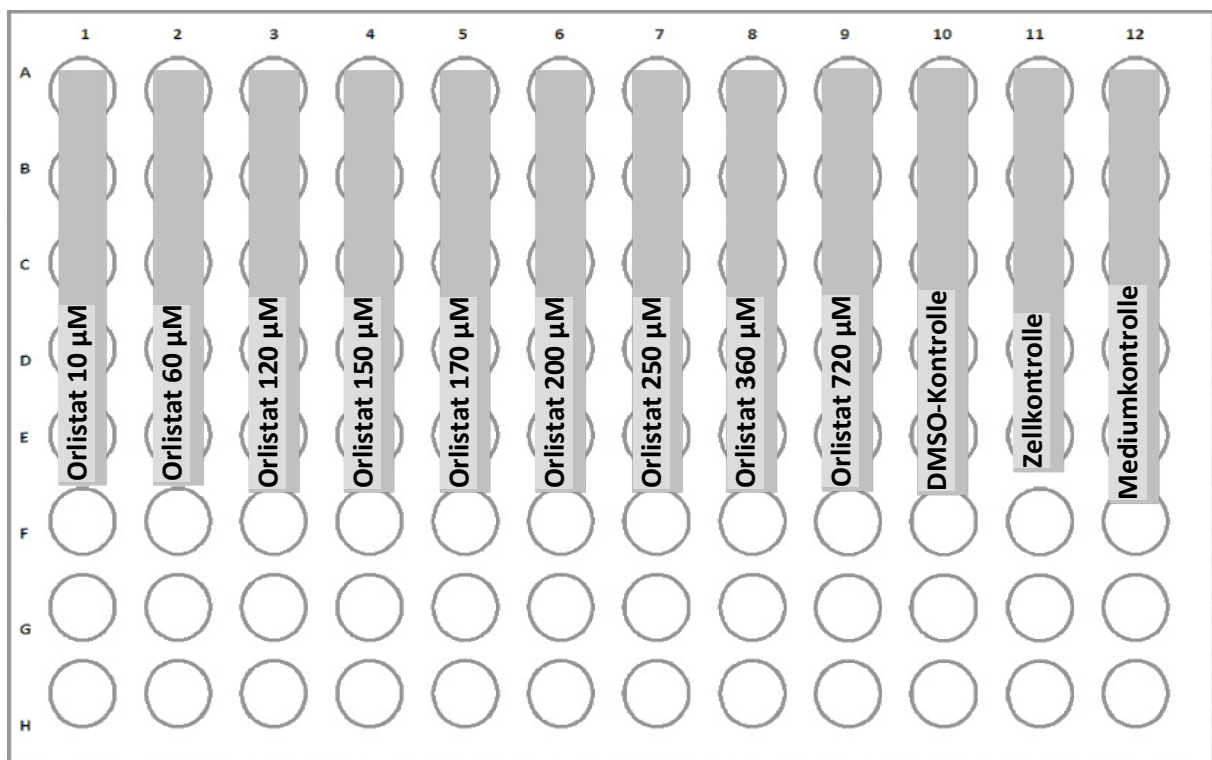


Abb. 5.1: Applikationschema für Orlistat in 96-Well-Platte (WST-1-Test)

Um die Wahrscheinlichkeit eines zufälligen Fehlers zu senken, wurden für jede Konzentration zwei parallele Ansätze verwendet. In den mit „Zellkontrolle“ beschrifteten Vertiefungen wurde lediglich das Medium gewechselt, die Zellen waren unbehandelt. Zu den mit „DMSO“ gekennzeichneten Zellen wurde 100  $\mu\text{l}$  DMSO hinzu gegeben. Zudem enthielten 8 Wells nur Medium und keine Zellen (Mediumkontrolle). Sie dienten als Kontrollen, um den

Einfluss des Mediums auf die Messung ermitteln zu können. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 24 h wurde „Cell Proliferation Reagent WST-1“ (Cell Proliferation Reagent WST-1 von Roche) in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration (10 µl/Well, das entspricht 1/10 des Volumens) zugegeben. WST-1 wird von der mitochondrialen Dehydrogenase zu Formazan umgesetzt. Die Menge des in der Zelle enthaltenen Formazans kann durch die Messung der Absorbanz im Spektrometer bei einer Wellenlänge von 450 nm ermittelt werden. Sie korreliert direkt mit der metabolischen Aktivität der Zelle und gibt so Auskunft über ihre Vitalität oder eventuelle Einbußen.

In einem initialen Versuch wurden Messungen der Zytotoxizität zu unterschiedlichen Zeiten (0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h) durchgeführt, um den optimalen Zeitpunkt der Zytotoxizitätsbestimmung zu bestimmen. Dieser stellte sich als vier Stunden nach WST-1-Zugabe heraus. Von den ermittelten Messergebnissen wurde für jeweils die Orlistat-Konzentrationen, die DMSO-, Zell- und Mediumkontrollen je ein Durchschnittswert ermittelt. Von diesem wurde der Wert der Mediumkontrollen abgezogen, um sicher zu gehen, dass Veränderungen in der Vitalität der Zellen ausschließlich durch die Stoffzugaben hervorgerufen wurden. Die Werte wurden in Relation zur Zellkontrolle (entspricht 100 %-iger Vitalität) gesetzt und so der Einfluss von Orlistat ermittelt. Für die in den folgenden Versuchen verwendeten Orlistat-Konzentrationen wurde der Zytotoxizitätstest wiederholt durchgeführt, um den Einfluss zufälliger Fehler zu minimieren.

Neben Orlistat wurde nach oben beschriebenem Verfahren auch der Einfluss von Phloretin (Sigma-Aldrich) und der Kombination beider Substanzen auf die Zellvitalität bestimmt. Hierbei wurde die Zytotoxizität von Phloretin in den Konzentrationen 10 µM, 20 µM, 100 µM und 200 µM (Stammlösung 200 mM) und die Kombination beider Stoffe in den Konzentrationen 170 µM (Orlistat) und 20 µM (Phloretin) ermittelt.

## **5.6 Quantifizierung der Viruslast nach Substanzapplikation**

In vier 24-Well Platten wurden je Well 500 µl Zellsuspension der Konzentration  $2 \times 10^5$  Zellen bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> für 48 h kultiviert. Anschließend wurde die aktuelle Zellzahl bestimmt und eine MOI von 10 errechnet. Die Inkubation mit 500 µl Orlistat in DMSO erfolgte in einem ersten Versuch eine Stunde vor der Infektion für eine Stunde bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub>. Dabei wurden die Konzentrationen 120 µM, 150 µM und 170 µM in Nährmedium verwendet. In die mit „DMSO“ beschrifteten Vertiefungen

wurde nur DMSO als Kontrolle zugegeben, die Zell- und Viruskontrollen blieben unbehandelt, es wurde lediglich das Medium ersetzt (s. untenstehendes Plattenschema, Tab. 5.1).

**Tab. 5.1: Plattenschema zur Fettsäuresynthase-Inhibition mittels Orlistat**

120 µM Orlistat	150 µM Orlistat	170 µM Orlistat	Zellzahl
120 µM Orlistat	150 µM Orlistat	170 µM Orlistat	Zellkontrolle
120 µM Orlistat	150 µM Orlistat	170 µM Orlistat	
DMSO-Kontrolle	DMSO-Kontrolle	DMSO-Kontrolle	
Viruskontrolle	Viruskontrolle	Viruskontrolle	

Die Infektion mit CVB3 erfolgte mit einem Infektionsvolumen von 200 µl Medium (ohne FKS) je Well für eine Stunde im Inkubator. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig mit 300 µl Medium gewaschen und erneut Orlistat in den entsprechenden Konzentrationen bzw. DMSO bzw. Medium zugegeben und für eine Stunde bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. 2, 4, 6 und 10 h nach Infektionsbeginn (p. i.) wurde vorsichtig der Überstand gewonnen und die Proben bei -20° C eingefroren. Der Zellrasen wurde erneut mit 500 µl Medium bedeckt und durch dreimaliges Gefriertauen das intrazelluläre Virus freigesetzt. Zellreste wurden abzentrifugiert. Alle Überstände wurden mittels TCID<sub>50</sub>-Test (siehe unten) titriert und ausgewertet.

In einem weiteren Versuch wurde Orlistat erst eine Stunde nach Infektionsbeginn zugegeben („gleichzeitig“). In einem dritten Versuchsansatz erfolgte die Zugabe nachdem das virushaltige Medium entfernt und für eine Stunde durch Medium ersetzt worden war („1 Stunde p. i.“).

In einem zweiten Versuchsansatz wurde an Stelle von Orlistat Phloretin verwendet. Die Zugabe erfolgte eine Stunde vor Infektionsbeginn analog des in Tab. 5.1 dargestellten Plattenschemas in den Konzentrationen 20 µM, 100 µM und 200 µM. Auch hier wurden die Überstände gewonnen und durch Gefriertauen die intrazellulären Viren freigesetzt. Die Proben wurden mittels TCID<sub>50</sub>-Test titriert und ausgewertet.

Gleiches Vorgehen galt für die Verwendung von 170 µM Orlistat, 20 µM Phloretin und der Kombination beider Substanzen in drei unabhängigen Ansätzen.

## 5.7 Virustiterbestimmung mittels TCID<sub>50</sub>-Test

In die Vertiefungen einer 96 Well Platte wurden jeweils 100 µl Zellsuspension pipettiert und für 60 Minuten bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5 %CO<sub>2</sub> inkubiert, um die Zellen auf den Boden sinken zu lassen. Während der Inkubationszeit wurde die Virusverdünnung hergestellt. Dazu wurden in eine weitere 96 Well Platte in jede Vertiefung 225 µl Medium gegeben.

Beginnend mit der Konzentration der Stammlösung ( $1,58 \times 10^9/\text{ml}$ ) wurden je 25  $\mu\text{l}$  in eine Einsenkung pipettiert, von welcher aus das Virus bis zu einem Faktor von  $10^{-6}$  verdünnt wurde (Abb. 5.2). Von der entstandenen Verdünnungsreihe wurden je 50  $\mu\text{l}$  einer Verdünnungsstufe in je eine Vertiefung der zellbestückten 96 Well Platte gegeben. Nach 4 bis 6 Tagen Inkubationszeit bei  $37^\circ\text{C}$ , 95% Luftfeuchtigkeit und 5%  $\text{CO}_2$  konnten die Zellen unter dem Lichtmikroskop hinsichtlich eines eingetretenen zytopathischen Effekts untersucht werden. Der Endpunkt der Verdünnung (die Virenkonzentration, bei der 50% der Testeinheiten infiziert waren.) wurde nach Reed und Muench bestimmt (Reed und Muench 1938). Der Kehrwert des Endpunktes ergab den gesuchten Virus Titer.

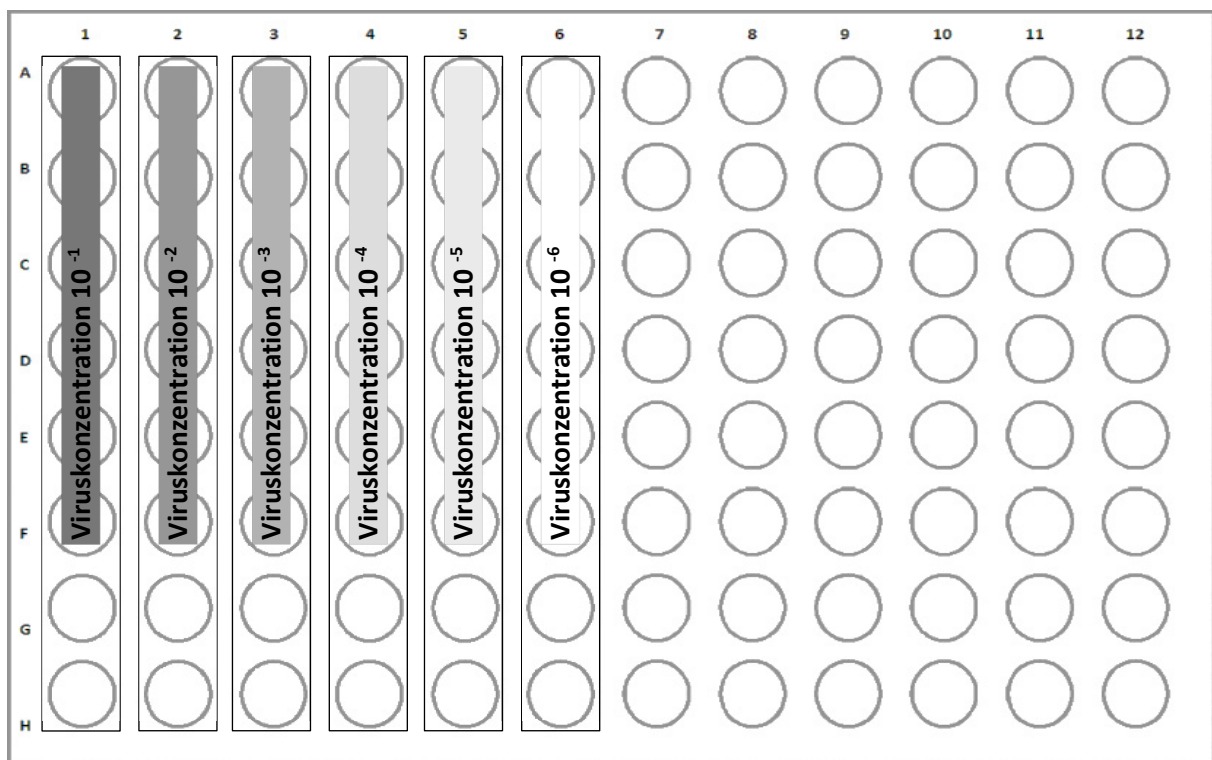


Abb. 5.2: TCID<sub>50</sub>-Test Verdünnungsreihenschema in 96 Well Platte

## 5.8 Berechnung des IC<sub>50</sub>-Wertes

Zur Ermittlung des IC<sub>50</sub>-Wertes wurde für jede logarithmische Darstellung des Virustiters zu verschiedenen Zeitpunkten (vgl. Abb. 6.9) die Orlistat-Konzentration berechnet, bei der die Virusreplikation zu 50% gehemmt war. Dazu wurde für jede linear fallende Gerade die Funktionsgleichung aufgestellt. Die allgemeine Form ist durch  $f(x)=a \cdot x+b$  beschrieben. Die lineare Annäherung ist hierbei erlaubt, da die Daten logarithmisch dargestellt sind. Die zur Berechnung des IC<sub>50</sub>-Wertes benötigten Werte des Virustiters ( $\ln \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ ) und die der Orlistat-Konzentrationen wurden den Rohdaten entnommen. Mittels dieser Daten wurden

über die allgemeine Form der Geradengleichung für zwei frei gewählte Punkte die Variablen  $a$  und  $b$  bestimmt. Mit den ermittelten Unbekannten konnte nun die zugehörige Funktionsgleichung angegeben werden. Um den  $IC_{50}$ -Wert zu berechnen, wurde der, bei der Konzentration=0 ermittelte, Virustiter ( $0/y$ ) halbiert. Dies entspricht dem Titer einer zu 50% inhibierten Replikation:  $y:2 = \frac{y}{2}$

$\frac{y}{2}$  wird in die bestehende Geradengleichung eingesetzt und diese nach  $x$  aufgelöst:

$$\frac{y}{2} = a \cdot x + b \leftrightarrow x = \frac{-b + \frac{y}{2}}{a}$$

Der ermittelte Wert entspricht dem  $IC_{50}$ -Wert in  $\mu M$ , also der Konzentration, bei der die Hälfte der Replikation gehemmt war.

## **5.9 Einfluss der Inhibition der Fettsäuresynthase mittels Orlistat und der Fettsäureaufnahme mittels Phloretin auf die Replikation von CVB3-EGFP**

Der Versuchsablauf entspricht dem unter 5.6 beschriebenen. Statt einer 96 Well Platte wurde eine 24 Well Platte verwendet und runde Deckgläschen in die Vertiefungen gegeben. Diese wurden mit 500  $\mu l$  Zellsuspension ( $2 \times 10^5$  Zellen/ml) bedeckt und 24 h inkubiert. Die Orlistat-Zugabe (170  $\mu M$ ) erfolgt eine Stunde vor Infektionsbeginn. Die Infektion wurde mit CVB3-EGFP (MOI 10) vorgenommen und die Zellen für 24 Stunden inkubiert, da CVB3-EGFP für die Replikation mehr Zeit benötigt als CVB3H3 (Ammer, 2015). Nach der Gewinnung des Überstandes wurden die Zellen fixiert. Dazu wurden sie zweimal mit PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung) gewaschen und anschließend durch die Behandlung mit 4%-igem Paraformaldehyd (Morphisto) für 20 Minuten bei 4°C fixiert. Nach zwei erneuten Waschungen mit PBS für je 10 Minuten erfolgte die Zellkernfärbung mittels Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich). Dazu wurde dieser im Verhältnis 1:500 in PBS verdünnt. Der Farbstoff durchdringt die Zellmembran und lagert sich an der DNA an. So kann die Morphologie der Zellkerne untersucht werden. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 37°C wurden die Proben erneut dreimal mit PBS gewaschen und die Deckgläschen vorsichtig in Fluorescent mounting medium (Dako) auf Objektträgern eingebettet. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 2 MOT; Zeiss Jena).

Analog zur Orlistat-Applikation wurde in einem zweiten Versuchsansatz Phloretin (20  $\mu$ M) verwendet. Ebenso wurde mit der Kombination beider Substanzen verfahren (Orlistat 170  $\mu$ M, Phloretin 20  $\mu$ M).

### 5.10 Darstellung der Fettsäureaufnahme in CVB3-infizierte Zellen

Zur Etablierung der Methode wurden die Zellen parallel mit CVBH3 oder CVB3-EGFP infiziert. In die Vertiefungen einer 24 Well Platte wurden runde Deckgläschen gegeben und mit 500  $\mu$ l Zellsuspension bedeckt. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurde die aktuelle Zellzahl mittels einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die MOI wurde sowohl für CVB3 als auch CVB3-EGFP bestimmt. Die Infektion mit 200  $\mu$ l Infektionslösung des entsprechenden Virus (MOI 10) erfolgte nach folgendem Schema (Tab. 5.2), nachdem das vorgelegte Medium entfernt worden war. Die Zellkontrollen wurden nicht infiziert.

**Tab. 5.2: Plattenschema zur Fettsäureaufnahme in CVB3-infizierte GMK-Zellen**

CVB3 3 h	CVB3 9 h	CVB3-EGFP 9 h	CVB3-EGFP 23 h
CVB3 3 h	CVB3 9 h	CVB3-EGFP 9 h	CVB3-EGFP 23 h
CVB3 3 h	CVB3 9 h	CVB3-EGFP 9 h	CVB3-EGFP 23 h
CVB3 3 h	CVB3 9 h	CVB3-EGFP 9 h	CVB3-EGFP 23 h
Zellkontrolle 3 h	Zellkontrolle 9 h	Zellkontrolle 9 h	Zellkontrolle 23 h
Zellkontrolle 3 h	Zellkontrolle 9 h	Zellkontrolle 23 h	Zellzahl

Die Zeitangaben beziehen sich dabei auf die Inkubationszeiten der Viren. Nach den aufgeführten Zeiten wurden die Deckgläschen in 200  $\mu$ l serumfreies Medium überführt. Das Medium war vorgewärmt und mit 5  $\mu$ l Bodipy 558/568-C12/ml (Molecular Probes, Life Technology) versetzt. Nach einer 60-minütigen Inkubationszeit bei 37°C wurden die Zellen vorsichtig zweimal mit PBS gewaschen und anschließend durch die Behandlung mit 4%-igem Paraformaldehyd für 20 Minuten bei 4°C fixiert. Danach wurden die Zellen erneut zweimal für je 10 Minuten mit PBS gewaschen und mittels Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 (1:500 in PBS) für 10 Minuten bei 37°C fixiert. Es erfolgten drei weitere Waschungen mit PBS bevor die Deckgläschen in Fluorescent mounting medium (Dako) auf Objektträgern eingebettet wurden. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Die Aufnahmen wurden mittels AxioCam color camera (Carl Zeiss, Jena) angefertigt.

Der Versuch wurde wiederholt, wobei nur CVB3-EGFP verwendet wurde und eine Bodipy 558/568-C12-Konzentration von 1  $\mu$ l/ml, um die Färbung etwas schwächer zu gestalten. Die Inkubationszeiten betrugen 2 h, 5 h, 8 h, 11 h und 23 h. In einer weiteren Modifikation des



Ausgangsversuches wurden die Effekte auf eine geringere Zellzahl untersucht. Zusätzlich zur ursprünglichen Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml wurde nun parallel die Konzentration von  $0,5 \times 10^5$  Zellen/ml untersucht. Ferner wurde eine MOI 100 verwendet. Bodipy 558/568-C12 ist ein Fettsäureanalogon und wird wie Fettsäuren aus dem Extrazellarraum importiert, so dass es die Zellen rot färbt.

### **5.11 Einfluss der Inhibition der Fettsäuresynthese mittels Orlistat und der Fettsäureaufnahme mittels Phloretin auf die Darstellung der Fettsäureaufnahme in CVB3-EGFP-infizierten Zellen**

Nach dem unter 5.9 beschriebenen Versuchsaufbau wurden in eine mit runden Deckgläschen versehene 24 Well-Platte in jede Vertiefung 500 µl Zellsuspension gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurde die aktuelle Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt. Eine Stunde vor Infektionsbeginn wurde Orlistat in der Konzentration 170 µM hinzugegeben. DMSO bzw. Medium wurden als Kontrollen appliziert. Vor der Infektion wurde das Medium entfernt. Die Infektion erfolgte mit 200 µl CVB3-EGFP (MOI 100). Die Zellkontrollen wurden nicht infiziert. Eine Stunde nach Infektionsbeginn wurden die Zellen vorsichtig mit 300 µl Medium gewaschen und die Injektionslösung durch Orlistat- bzw. DMSO-haltiges bzw. Medium (500 µl) für eine Stunde ersetzt (Inkubation bei 37°C). Nach 9 und 23 h wurden die Deckgläschen in 200 µl serumfreies Medium überführt. Das Medium war vorgewärmt und mit 1 µl Bodipy/ml versetzt. Die Proben mit einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden zum Vergleich nicht mit Bodipy angefärbt. Nach einer 60 minütigen Inkubationszeit bei 37° C wurden die Zellen vorsichtig zweimal mit PBS gewaschen und anschließend durch die Behandlung mit 4%-igem Paraformaldehyd für 20 Minuten bei 4°C fixiert. Danach wurden die Zellen erneut zweimal für je 10 Minuten mit PBS gewaschen und mittels Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 (1:500 in PBS) für 10 Minuten bei 37°C fixiert. Es erfolgte drei weitere Waschungen mit PBS bevor die Deckgläschen in Fluorescent mounting medium (Dako) auf Objektträgern eingebettet wurden. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Die Aufnahmen wurden mittels AxioCam color camera (Carl Zeiss, Jena) angefertigt.

In gleicher Weise wurde mit Phloretin (20 µM) statt Orlistat und der Kombination beider Substanzen (Orlistat 170 µ, Phloretin 20 µM) verfahren.

## **5.12 Erstellung elektronenmikroskopischer Bilder**

Für die Elektronenmikroskopie wurden in 60 mm Zellkulturschalen 5 ml Zellsuspension ( $2 \times 10^5$  Zellen) ausgesät und bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> für 36 h inkubiert. Anschließend wurde PBS auf 37°C angewärmt, mit 1% Saccharose und 2 mM CaCl<sub>2</sub> versetzt. Das Nährmedium wurde entfernt, durch 5 ml des vorbereiteten PBS ersetzt und die Zellkultur vorsichtig gespült. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 5 ml angewärmtem 2,5 %-igem Glutaraldehyd (Serva) in PBS (versetzt mit 1% Saccharose und 2 mM CaCl<sub>2</sub>) für 60 Minuten bei 37°C. Nachfolgend wurde das Glutaraldehyd entfernt und 1 ml PBS zugegeben. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers von der Oberfläche der Kulturschale gelöst und durch mehrmaliges Mischen mit einer Pipette resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension in Eppendorf Cups überführt und mit 600 g zentrifugiert, so dass sich ein Pellet am Boden der Cups bildete. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte die Fixation in Osmiumtetroxid (Serva, Deutschland) für 1 Stunde. Durch aufsteigende Ethanolreihen wurde den Proben Wasser entzogen und mittels Uranylacetat (Ted Pella) die Negativkontrastierung vorgenommen. Anschließend wurden die Proben in Ethoxylinharz (Araldite; Agar Scientific) eingeschlossen. Die Ultradünnschnitte wurden mittels LKB Ultratom III (LKB, Stockholm, Schweden) durchgeführt. Diese wurden auf Kupfer-Trägernetzchen aufgezogen und mit Blei-Citrat nachkontrastiert. Danach wurden die Proben unter einem Transmissionselektronenmikroskop (EM 900, Zeiss, Oberkochen) bei 80 kV untersucht.

## **5.13 Statistische Auswertung**

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde eine multiple lineare Regressionsanalyse verwendet. Durch dieses Verfahren konnte die Abhängigkeit einer Variable Y von metrischen Größen X beschrieben werden. Zudem galt es zu erfassen, inwieweit Ausprägungen der Y-Variablen durch Variationen von X erklärt werden konnten (Quinn und Keough 2002). Um ordinale Größen zu berücksichtigen, wurden sogenannte Dummy-Variablen codiert. Die Voraussetzungen des Modells (Normalverteilung der Residuen, Varianzhomogenität, Unabhängigkeit der Y-Werte, feste X-Werte) wurden dabei eingehalten. Der Normalverteilung der Residuen wurde durch eine ausführliche Regressionsanalyse (Logarithmierung der abhängigen Variablen und der Zeit) entsprochen. Die Berechnungen erfolgten mit dem Statistikprogramm SAS .

Abhängige Variable:

- Virustiter

Unabhängige Variablen:

- Orlistat-Konzentration (120  $\mu$ M, 150  $\mu$ M, 170  $\mu$ M, DMSO=0  $\mu$ M) bzw. Phloretin-Konzentration (20  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, DMSO=0  $\mu$ M)
- Auswertungszeitpunkte (2h p. i., 4 h p. i., 6 h p. i., 10 h p. i.)
- Orlistat/-Phloretinzugabezeiten (1 h vor Infektion, zeitgleich mit Infektion, 1 h nach Infektion)
- Intrazellulär/Extrazellulär bestimmter Virustiter

Dummy-Codierung:

- Zugabezeit 1 h vor Infektion = -1
- Zugabezeit zeitgleich mit Infektion = 0
- Zugabezeit 1 h nach Infektion = 1
- Intrazellulärer Virustiter = -1
- Extrazellulär Virustiter = 1

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Überblick

Coxsackieviren bilden aus Membranen des ER und des Golgi-Apparats sogenannte Viroplasmen. Sie bringen so zum einen virale RNA und Replikationsenzyme in engen Kontakt, zum anderen kann die Replikation vor den Abwehrmechanismen der Wirtszelle geschützt ablaufen. Dieser Prozess geht mit einem erhöhten Bedarf an Fettsäuren einher (Netherton und Wileman 2011). Neue Behandlungsansätze zielen darauf ab, das Fettsäureangebot zu minimieren und so möglicherweise die Virusreplikation einzuschränken (Wilsky *et al.* 2011). Im Folgenden wurden die Inhibition der Fettsäuresynthese mittels Orlistat und die Hemmung der Fettsäureaufnahme mittels Phloretin untersucht.

### 6.2 Orlistat

#### 6.2.1 Zytotoxizitätstest für Orlistat mittels WST-1

Um festzustellen, ob Orlistat einen negativen Einfluss auf die Vitalität von GMK-Zellen hat, wurde mittels WST-1 Test die metabolische Aktivität der Zellen nach Orlistat-Zugabe bestimmt. Die Tabelle (Tab. 6.1) zeigt die untersuchten Orlistat-Konzentrationen sowie DMSO und die jeweils gemessenen Werte der Zellvitalität in Prozent der Zellkontrolle.

Konzentration ( $\mu\text{M}$ )	Zellvitalität (%)
10	105,04 ( $\pm 0,00$ )
60	109,83 ( $\pm 1,82$ )
120	110,58 ( $\pm 1,85$ )
150	107,13 ( $\pm 0,00$ )
170	103,41 ( $\pm 1,61$ )
200	93,83 ( $\pm 0,00$ )
250	59,99 ( $\pm 3,10$ )
360	56,67 ( $\pm 0,00$ )
720	44,73 ( $\pm 0,00$ )
DMSO	101,45 ( $\pm 1,30$ )
Zellkontrolle	100,00 ( $\pm 0,06$ )

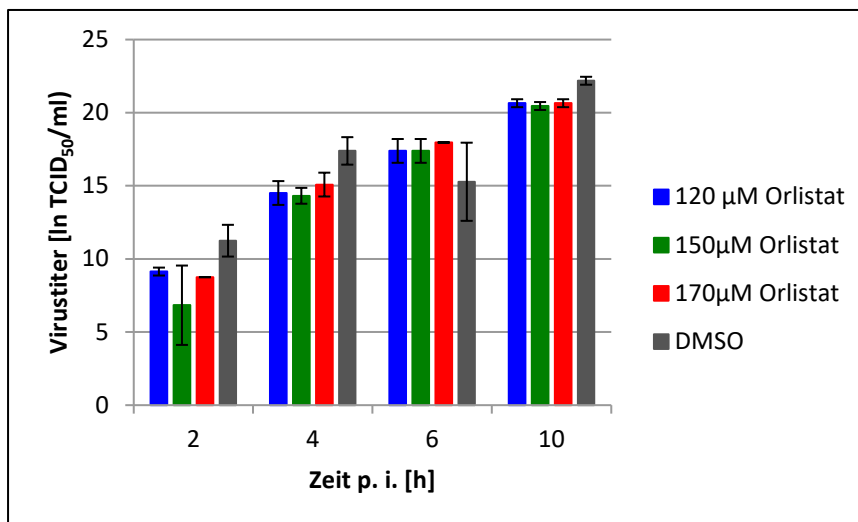
**Tab. 6.1: Zellvitalität in Abhängigkeit von verschiedenen Orlistat-Konzentrationen.**

Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurde zu den Zellkulturen entweder Orlistat in den Konzentrationen 10  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$ , 120  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$ , 170  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 360  $\mu\text{M}$  und 720  $\mu\text{M}$  oder DMSO zugegeben. DMSO diente auch als Lösungsmittel für Orlistat. Die Zellkontrolle blieb unbehandelt. Vier Stunden nach Zugabe von Cell Proliferation Reagent WST-1 wurde der metabolische Umsatz der Substanz durch ein Spektrometer ermittelt. Die Ergebnisse der Messungen pro Orlistat-Konzentration bzw. für DMSO wurden jeweils gemittelt und ins Verhältnis zur unbehandelten Zellkontrolle gesetzt, um den Einfluss von Orlistat bzw. DMSO auf die Zellvitalität zu bestimmen. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen für die Orlistat-Konzentrationsstufen, sowie für DMSO und die Zellkontrolle.

Zudem wurde der Effekt von DMSO kontrolliert, da DMSO als Lösungsmittel verwendet wurde. Während die metabolische Aktivität der Zellen bei 10  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$ , 120  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$ , 170  $\mu\text{M}$ , sowie bei der DMSO-Kontrolle der der Zellkontrolle gleich, zeigte sich ab 200  $\mu\text{M}$  ein Abfall. Der  $\text{IC}_{50}$  für Orlistat lag bei 560,723  $\mu\text{M}$ . Bei dieser Konzentration wird das Zellwachstum bezogen auf die Zellkontrolle um 50% reduziert. In geringeren Dosierungen hatte Orlistat keinen negativen Einfluss auf die Vitalität von GMK-Zellen. Gleiches galt für DMSO.

### 6.2.2 Einfluss der Fettsäuresynthase-Inhibition mittels Orlistat auf die Virusreplikation

Um den Einfluss von Orlistat auf die Fettsäuresynthase und damit möglicherweise auf die Virusreplikation zu untersuchen, wurde Orlistat zunächst als prophylaktische Gabe 1 h vor Infektion mit CVB3 zugegeben. Somit war eine ausreichende Hemmung der Fettsäuresynthase gewährleistet. Dabei wurden die nicht-toxischen Orlistat-Konzentrationen 120  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$  und 170  $\mu\text{M}$  verwendet. Zugleich wurden DMSO- (mit DMSO behandelt, mit CVB3 infiziert) und Zellkontrollen (unbehandelt, nicht infiziert) mitgeführt. Die im Folgenden illustrierte Auswertung erfolgte getrennt für den Intra- und den Extrazellularraum. Es zeigte sich intrazellulär ein kontinuierlicher Anstieg der Viruskonzentration im Zeitraum von 2 h p. i. bis 10 h p. i. (Abb. 6.2).



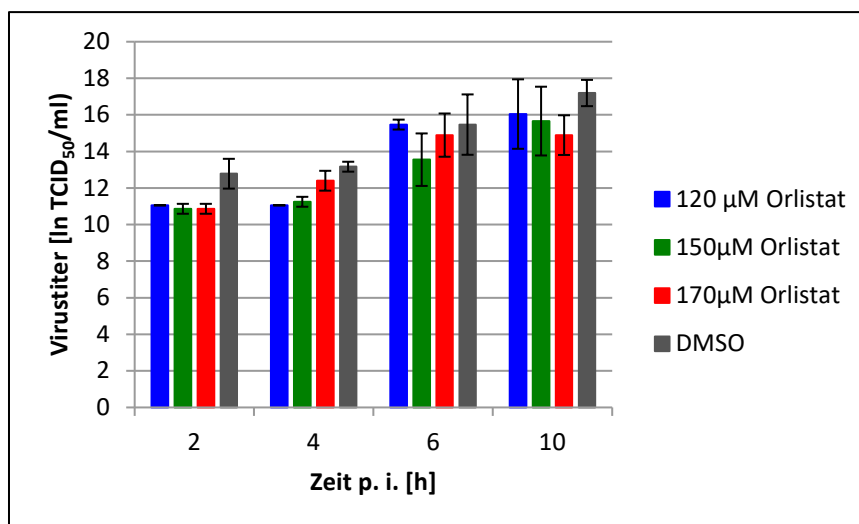
**Abb. 6.2: Intrazellulärer Virustiter 2 h, 4 h, 6 h und 10 h nach Infektion mit CVB3.** Die Orlistat-Zugabe erfolgte 1 h vor der Infektion mit CVB3 (MOI 10). Es wurden die Orlistat-Konzentrationen 120  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$  und 170  $\mu\text{M}$  verwendet, sowie eine DMSO-Kontrolle. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der Überstand gewonnen und durch mehrmaliges Gefriertauen das

intrazelluläre Virus freigesetzt. Der Virustiter wurde mittels  $\text{TCID}_{50}$ -Test ermittelt. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD aus je drei Proben/Zeitpunkt für die verwendeten Orlistat-Konzentrationen und die DMSO-Kontrolle.

Dabei ergaben sich Unterschiede hinsichtlich der Titerhöhe abhängig von einer Vorbehandlung mit Orlistat oder keiner Vorbehandlung (DMSO). Der Virustiter war niedriger,

wenn eine Behandlung mit Orlistat erfolgt war. Die Unterschiede zwischen den Orlistat-Konzentrationen (120  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$ , 170  $\mu\text{M}$ ) waren hingegen intrazellulär nicht eindeutig. Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert betrug für 2 h p. i. 92,82  $\mu\text{M}$ , für 4 h p. i. 116,88  $\mu\text{M}$ , für 6 h p. i. 111,11  $\mu\text{M}$  und für 10 h p. i. 120,14  $\mu\text{M}$ .

Für den extrazellulär ermittelten Virustiter ergaben sich eindeutiger Ergebnisse (Abb. 6.3). Auch hier zeigte sich ein Anstieg des Virustiters im Zeitverlauf, sowohl bei allen Orlistat-Konzentrationen, als auch bei DMSO. Die Viruslast nach 10 h lag jedoch deutlich unter der intrazellulären. Wie auch intrazellulär lagen die Titer der mit Orlistat behandelten Proben unter denen der DMSO-Kontrollen. Besonders 10 h p. i. wurde zudem eine Konzentrations-Abhängigkeit erkennbar: Bei den mit 170  $\mu\text{M}$  versehenen Proben fiel die Viruslast deutlich geringer aus. Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert betrug für 2 h p. i. 67,29  $\mu\text{M}$ , für 4 h p. i. 91,18  $\mu\text{M}$ , für 6 h p. i. 106,32  $\mu\text{M}$  und für 10 h p. i. 94,15  $\mu\text{M}$ .

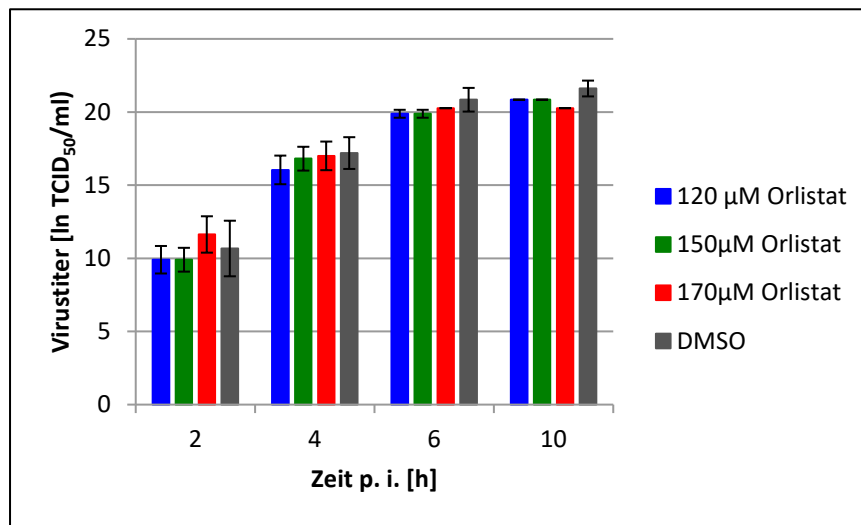


**Abb. 6.3: Extrazellulärer Virustiter 2 h, 4 h, 6 h und 10 h nach Infektion mit CVB3** Die Orlistat-Zugabe erfolgte 1 h vor der Infektion mit CVB3 (MOI 10). Es wurden die Orlistat-Konzentrationen 120  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$  und 170  $\mu\text{M}$  verwendet, sowie eine DMSO-Kontrolle. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der Überstand mit dem darin enthaltenen extrazellulären Virus gewonnen. Der Virustiter

wurde mittels  $\text{TCID}_{50}$ -Test ermittelt. Dargestellt sind die  $\text{MW} \pm \text{SD}$  aus je drei Proben/Zeitpunkt für die verwendeten Orlistat-Konzentrationen und die DMSO-Kontrolle.

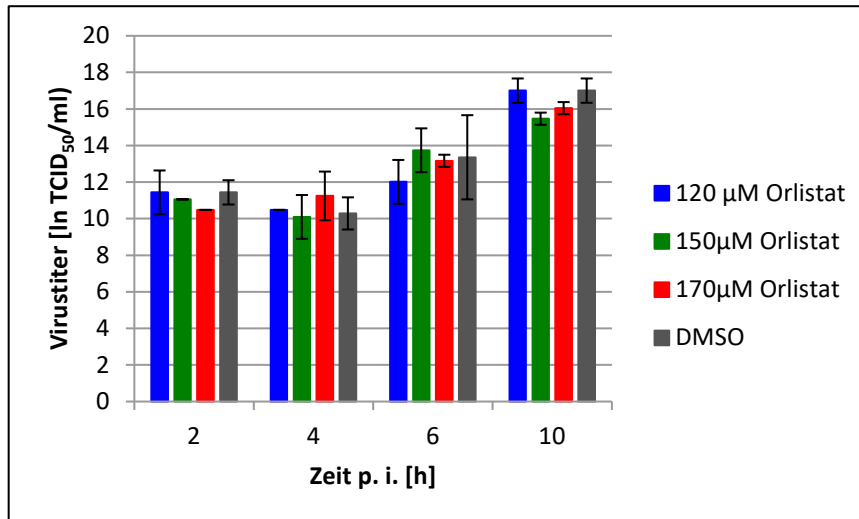
Um die Wirkung von Orlistat auf bereits infizierte Zellen beurteilen zu können, wurde Orlistat in einem Versuch gleichzeitig mit CVB3 bzw. in einem anderen Versuch 1 h nach Infektion zugegeben.

Bei einer Orlistat-Zugabe gleichzeitig mit der Infektion zeigte sich intrazellulär ein Anstieg des Virustiters zwischen 2 h p. i. und 10 h p. i. (Abb. 6.4). Bei den mit Orlistat behandelten Proben verlief der Anstieg zu Beginn steiler, als bei einer Orlistat-Zugabe 1 h vor Infektion, verflachte aber 6 h p. i., so dass sich die Titer 10 h p. i. dicht beieinander lagen: ln (20,65/ml) bei Zugabe von 170  $\mu$ M 1 h vor Infektion und ln (20,27/ml) bei zeitgleicher Applikation. Ein dosisabhängiger Einfluss von Orlistat auf den Titer zeigte sich nach 10 h deutlicher, als bei der Orlistat-Zugabe 1 h vor Infektion. Der IC<sub>50</sub> betrug für 2 h p. i. 87,5  $\mu$ M, für 4 h p. i. 111,33  $\mu$ M, für 6 h p. i. 126,47  $\mu$ M und für 10 h p. i. 114,59  $\mu$ M.



**Abb. 6.4: Intrazellulärer Virustiter 2 h, 4 h, 6 h und 10 h nach Infektion mit CVB3.** Die Orlistat-Zugabe erfolgte zeitgleich mit der Infektion mit CVB3 (MOI 10). Es wurden die Orlistat-Konzentrationen 120  $\mu$ M, 150  $\mu$ M und 170  $\mu$ M verwendet, sowie eine DMSO-Kontrolle. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der Überstand gewonnen und durch mehrmaliges Gefriertauen das intrazelluläre Virus freigesetzt. Der Virustiter wurde mittels TCID<sub>50</sub>-Test ermittelt. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD aus je drei Proben/Zeitpunkt für die verwendeten Orlistat-Konzentrationen und die DMSO-Kontrolle.

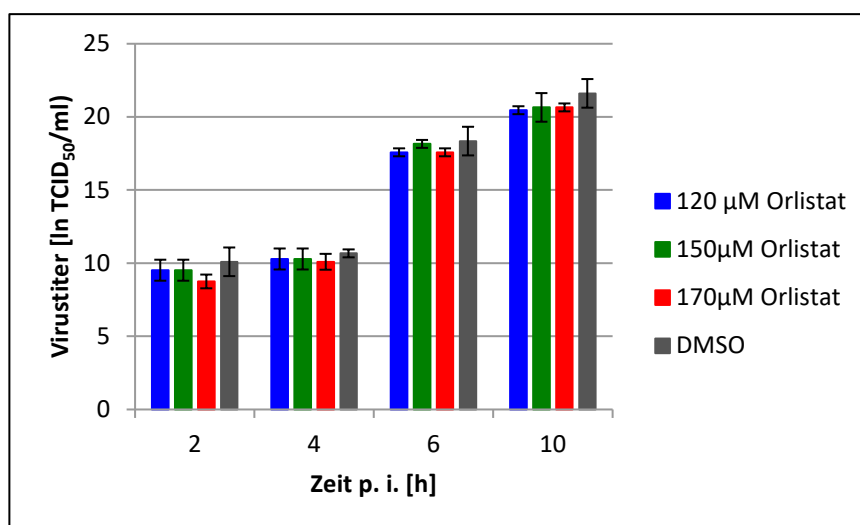
Auch bei den extrazellulär bestimmten Titern stieg die Viruslast im Zeitverlauf an (Abb. 6.5). Dabei wurde auch bei gleichzeitiger Orlistat-Zugabe ein geringerer Anstieg als intrazellulär deutlich (bei 170  $\mu$ M extrazellulär: ln (16,04/ml); bei 170  $\mu$ M intrazellulär: ln (20,27/ml)). Anders als bei den intrazellulär ermittelten Titern fiel extrazellulär der Anstieg zunächst flacher aus, als nach Orlistat-Zugabe 1 h vor Infektion, stieg aber 6 h p. i. stark an. Der IC<sub>50</sub> – Wert ergab für 2 h p. i. 61,07  $\mu$ M, für 4 h p. i. 85,64  $\mu$ M, für 6 h p. i. 100,77  $\mu$ M und für 10 h p. i. 86,77  $\mu$ M.



**Abb. 6.5: Extrazellulärer Virustiter 2 h, 4 h, 6 h und 10 h nach Infektion mit CVB3** Die Orlistat-Zugabe erfolgte zeitgleich mit der Infektion mit CVB3 (MOI 10). Es wurden die Orlistatkonzentrationen 120 µM, 150 µM und 170 µM verwendet, sowie eine DMSO-Kontrolle. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der Überstand mit

dem darin enthaltenen extrazellulären Virus gewonnen. Der Virustiter wurde mittels TCID<sub>50</sub>-Test ermittelt. Dargestellt sind die MW ± SD aus je drei Proben/Zeitpunkt für die verwendeten Orlistat-Konzentrationen und die DMSO-Kontrolle.

Abbildung 6.6 zeigt den intrazellulären Anstieg des Virustiters bei Orlistat-Gabe 1 h nach Infektion mit CVB3. Es fiel v. a. 2 h p. i. der deutliche Einfluss der unterschiedlichen Orlistat-Konzentrationen auf, im weiteren Verlauf der Infektion trat er in den Hintergrund. Der Titer erreichte nach 10 h einen ähnlichen Wert wie bei Orlistat-Zugabe 1 h vor Infektion bzw. zeitgleicher Zugabe (ln (20,65/ml) bei Gabe von 170 µM Orlistat 1 h vor Infektion, ln (20,27/ml) bei zeitgleicher Orlistat-Applikation und ln (20,65/ml) bei Orlistat-Gabe 1 h nach Infektion), der Anstieg erfolgte jedoch flacher. Der IC<sub>50</sub> betrug für 2 h p. i. 80,78 µM, für 4 h p. i. 105,29 µM, für 6 h p. i. 120,43 µM und für 10 h p. i. 108,46 µM.

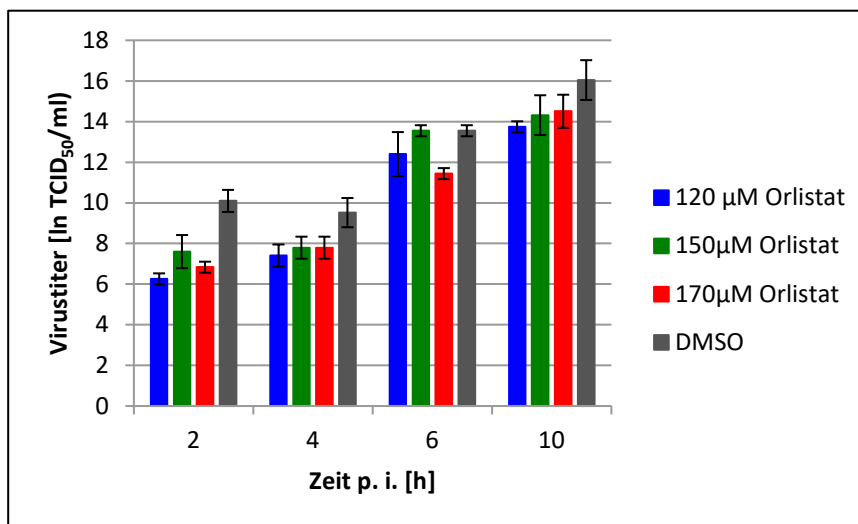


**Abb. 6.6: Intrazellulärer Virustiter 2 h, 4 h, 6 h und 10 h nach Infektion mit CVB3.** Die Orlistat-Zugabe erfolgte 1 h nach der Infektion mit CVB3 (MOI 10). Es wurden die Orlistat-Konzentrationen 120 µM, 150 µM und 170 µM verwendet, sowie eine DMSO-Kontrolle. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der Überstand gewonnen und durch mehrmaliges Gefriertauen

das intrazelluläre Virus freigesetzt. Der Virustiter wurde mittels TCID<sub>50</sub>-Test ermittelt. Dargestellt sind die MW ± SD aus je drei Proben/Zeitpunkt für die verwendeten Orlistat-Konzentrationen und die DMSO-Kontrolle.



Die extrazellulär ermittelte Viruslast nach Orlistat-Gabe 1 h nach Infektion (Abb. 6.7) lag unter den intrazellulären Titern. Sie fiel im Vergleich zu den anderen Orlistat-Zugabezeiten zu allen Untersuchungszeitpunkten geringer aus und erreichte auch nach 10 h eine geringere Höhe (nach Gabe von 170 µM 1 h vor Infektion: ln (14,89/ml), nach Gabe von 170 µM gleichzeitig mit Infektion: ln (16,04/ml); nach Gabe von 170 µM 1 h nach Infektion: ln (14,50/ml)). Ein allmählicher Anstieg im Zeitverlauf wurde auch hier deutlich, ein konzentrationsabhängiger Einfluss auf die Titerhöhe konnte nicht festgestellt werden. Der IC<sub>50</sub> betrug für 2 h p. i. 54,86 µM, für 4 h p. i. 79,66 µM, für 6 h p. i. 94,74 µM und für 10 h p. i. 82,33 µM.



**Abb. 6.7: Extrazellulärer Virustiter 2 h, 4 h, 6 h und 10 h nach Infektion mit CVB3** Die Orlistat-Zugabe erfolgte 1 h nach Infektion mit CVB3 (MOI 10). Es wurden die Orlistat-Konzentrationen 12 µM, 150 µM und 170 µM verwendet, sowie eine DMSO-Kontrolle. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der Überstand mit dem darin enthaltenen extrazellulären Virus gewonnen. Der Virustiter wurde mittels TCID<sub>50</sub>-Test ermittelt. Dargestellt sind die MW ± SD aus je drei Proben/Zeitpunkt für die verwendeten Orlistat-Konzentrationen und die DMSO-Kontrolle.

ren Virus gewonnen. Der Virustiter wurde mittels TCID<sub>50</sub>-Test ermittelt. Dargestellt sind die MW ± SD aus je drei Proben/Zeitpunkt für die verwendeten Orlistat-Konzentrationen und die DMSO-Kontrolle.

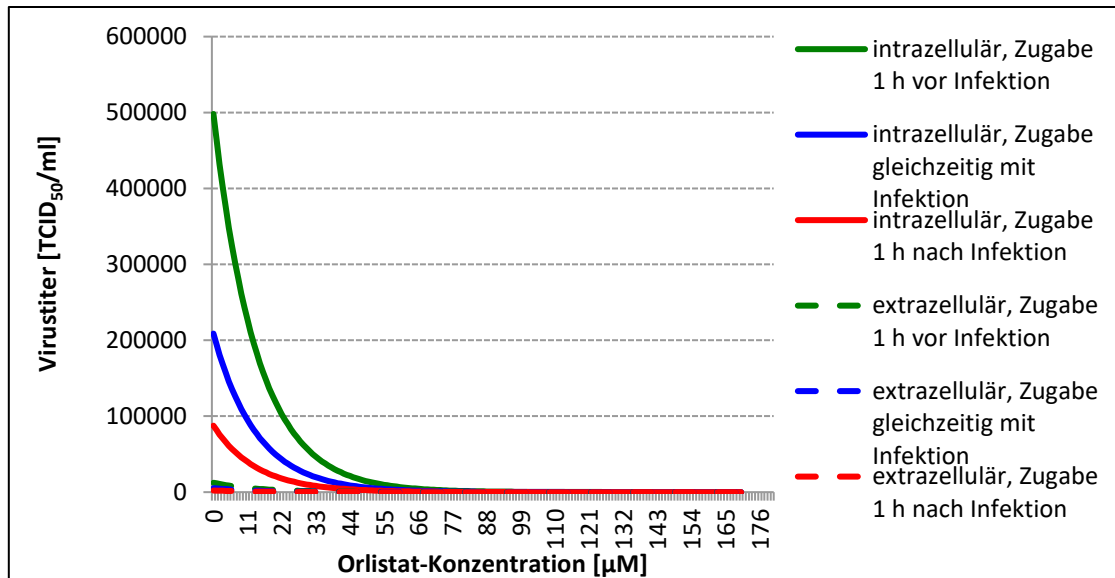
Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde eine multiple Regressionsanalyse verwendet. Dabei wurden der Einfluss der Orlistat-Konzentrationen bzw. DMSO (= Konzentration 0), der Lokalisation (intrazellulär/extrazellulär), der Untersuchungszeitpunkte (2 h p. i., 4 h p. i., 6 h p. i., 10 h p. i.), sowie der Zugabezeit von Orlistat auf die Höhe des Virustiters ermittelt:

$$\ln(V) = 6,68678 + 5,35739 \cdot \ln(t) - 0,07173511 \cdot O_{\text{Konz}} - 0,86925 \cdot Z - 1,84911 \cdot \text{Ort}$$

$$R^2 = 0,7966; \text{Pr} > F < 0,0001; n = 273$$

Mit Virustiter (V), Untersuchungszeitpunkt (t), Orlistat-Konzentration ( $O_{\text{Konz}}$ ), Zugabezeit (Z) und Lokalisation (Ort).

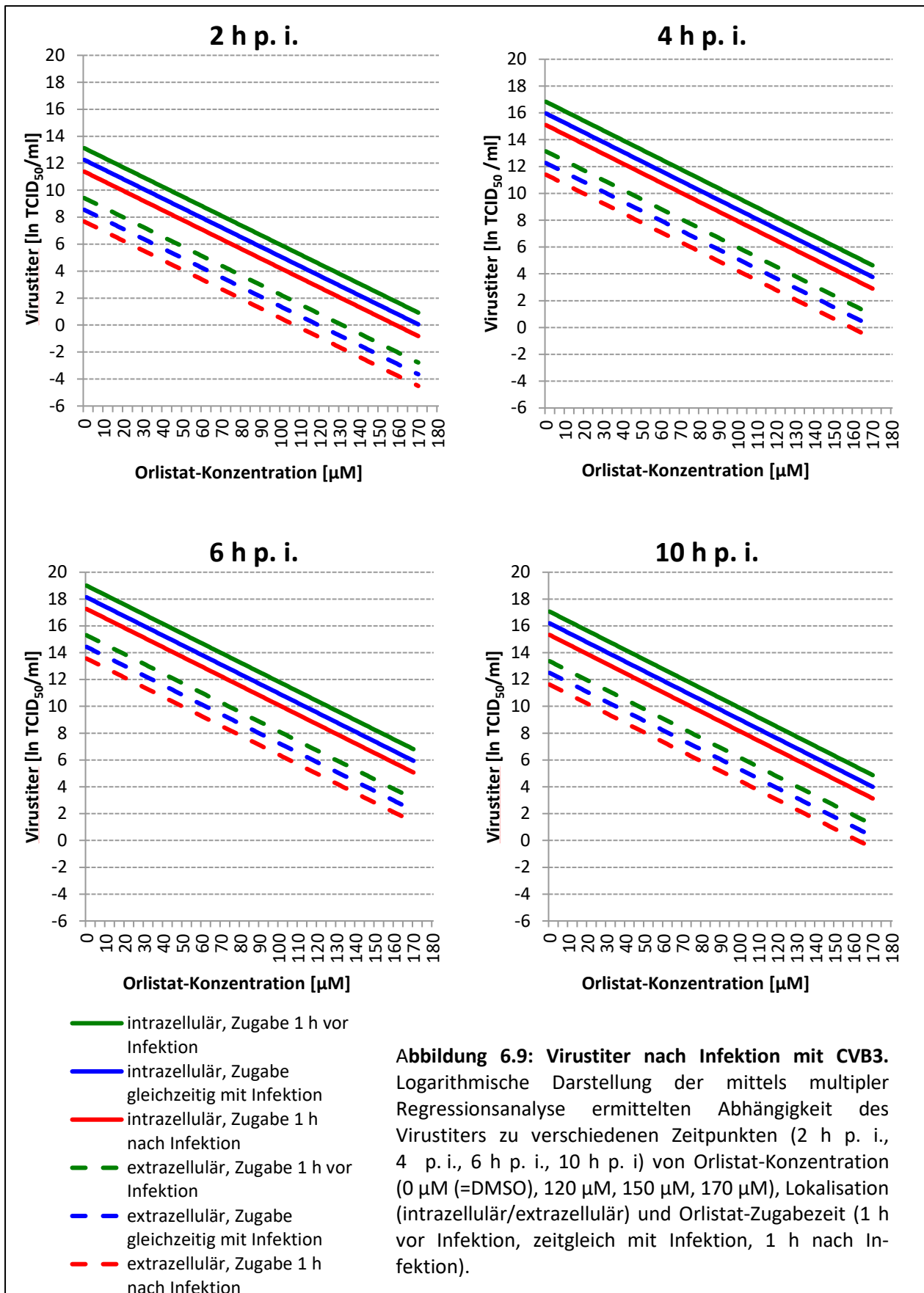
Abbildung 6.8 illustriert beispielhaft den Einfluss von Orlistat-Konzentration, Ort der Titerbestimmung (intrazellulär/extrazellulär) und Orlistat-Zugabezeit auf die Höhe des Virustiters.



**6.8: Virustiter 2 h nach Infektion mit CVB3.** Lineare Darstellung der mittels multipler Regressionsanalyse ermittelten Abhängigkeit des Virustiters von Orlistat-Konzentration (0 µM, 120 µM, 150 µM, 170 µM), Lokalisation (intrazellulär/extrazellulär) und Orlistat-Zugabezeit (1 h vor Infektion, zeitgleich mit Infektion, 1 h nach Infektion).

Wie Abbildung 6.8 verdeutlicht, ist die lineare Darstellung aufgrund der großen Unterschiede in der Titerhöhe unzureichend. Im Folgenden wird der Sachverhalt deshalb als logarithmische Abbildung verdeutlicht. Diese Form der Darstellung (Abb. 6.9 bis 6.12) veranschaulicht zu allen Zeitpunkten (2 h p. i., 4 h p. i., 6 h p. i., 10 h p. i.) eine statistisch signifikante Abhängigkeit des Virustiters von der Orlistat-Zugabezeit, der Lokalisation in der Zelle/im Extrazellularraum und der Orlistat-Konzentration. Dabei war der intrazellulär (durchgezogene Linien) ermittelte Titer signifikant höher als extrazellulär (unterbrochene Linien). Die Höhe des Titers ist also davon abhängig, ob der Intrazellularraum oder der Extrazellularraum untersucht wurde. Wurde Orlistat 1 h vor Infektion (grüne Kurve) hinzugegeben, lag der ermittelte Titer signifikant höher, als bei zeitgleicher Gabe (blaue Kurve). Am niedrigsten fiel der Titer bei einer Orlistat-Zugabe 1 h nach Infektion (rote Kurve) aus. Eine Orlistat-Zugabe nach Beginn der Infektion hemmte folglich den Titeranstieg am meisten, während eine Zugabe vor Beginn der Infektion die geringste Wirkung zeigte. Auch die Orlistat-Konzentration erwies sich als statistisch signifikante Einflussgröße: mit

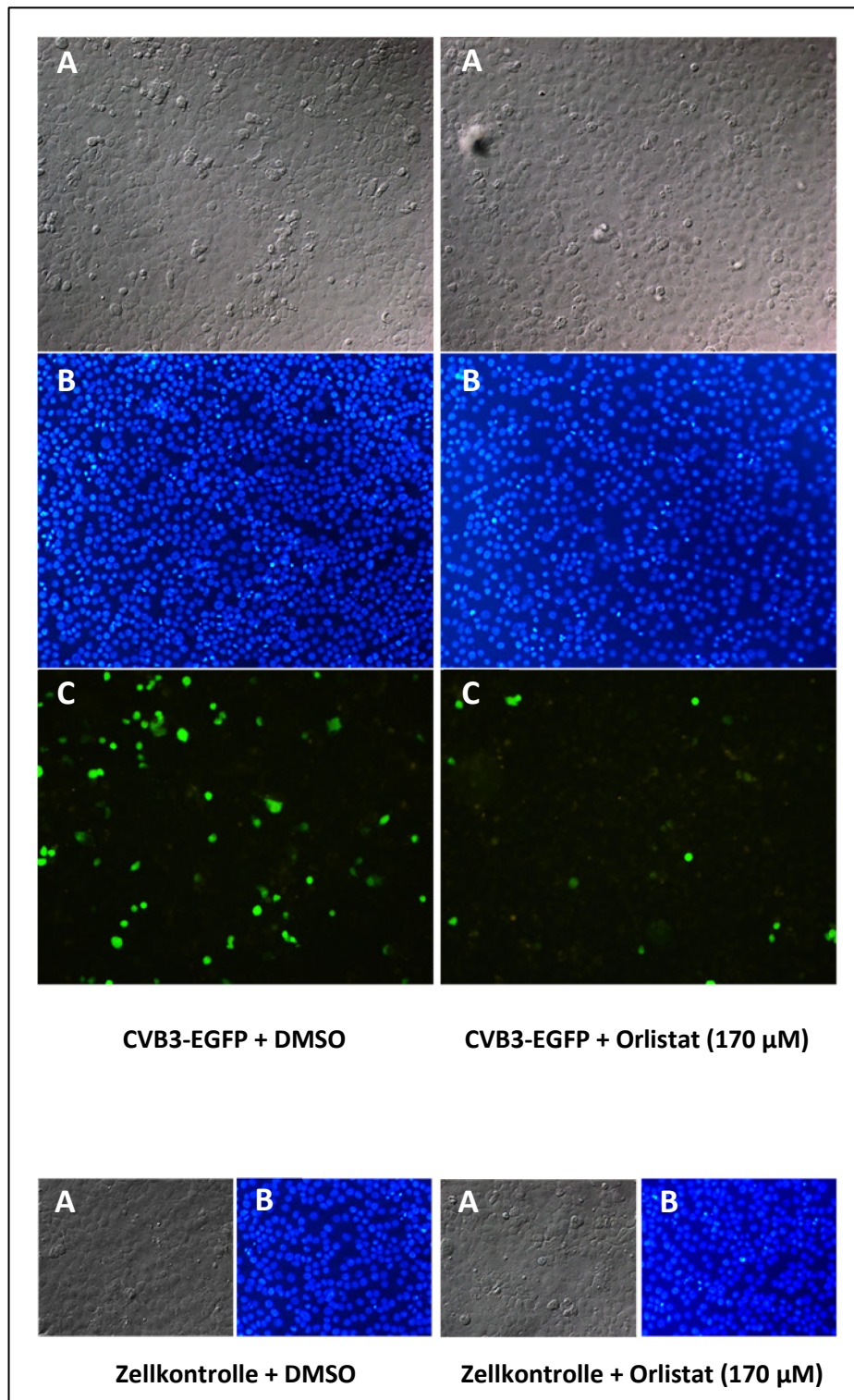
zunehmender Konzentration war der Titer exponentiell niedriger. Am höchsten war der Titer nach DMSO-Behandlung (=Konzentration 0).



### 6.2.3 CVB3-EGFP und Orlistat

1962 entdeckte Osamu Shimomura bei der Quallenart *Aequoria victoria* ein grün fluoreszierendes Protein (engl. green fluorescent protein, GFP). Es wurde in der Folge u. a. genutzt, um zelluläre Proteine zu markieren. Dabei wurde die Sequenz von GFP an Gene zellulärer Proteine gekoppelt. So konnten Proteinprozessierung und -bewegungen in der Zelle fluoreszenzmikroskopisch analysiert werden. Die verbesserte Form, das enhanced green fluorescent protein (EGFP), wurde auch zum Nachweis viraler Proteinsynthese verwendet, um so Infektion, Vermehrung und Verbreitung der Viren beobachten zu können. Dabei entsteht EGFP autokalytisch, es liegt also nach der Translation zusätzlich zu allen viralen Proteinen vor (Shimomura 1979, Slifka *et al.* 2001, Zimmer 2009).

Um den Einfluss von Orlistat auf die Virusreplikation auch optisch nachzuweisen, wurden die folgenden Versuche mit CVB3-EGFP durchgeführt und so die Virusvermehrung sowie -verbreitung fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Zu GMK-Zellen wurden 1 h vor Infektionsbeginn 170  $\mu$ M Orlistat gegeben und der Zellrasen nach 24 h auf Deckgläschen fixiert. Zudem wurde eine Kontrolle mitgeführt, die nur mit DMSO behandelt, sowie eine Zellkontrolle, die nicht behandelt und nicht infiziert wurde. Abbildung 6.10 zeigt GMK-Zellen nach Orlistat-Zugabe im Vergleich zu GMK-Zellen nach DMSO-Applikation. Die Teilabbildungen A illustrieren lichtmikroskopische Aufnahmen des Zellrasens nach 24 h, die Teilabbildungen B fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellkernfärbung und die Teilabbildungen C fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der grün fluoreszierenden CVB3-EGFP-infizierten Zellen. Deutlich zeigte sich ein Unterschied zwischen den mit DMSO und den mit Orlistat behandelten Proben: In der lichtmikroskopischen Darstellung (Teilabbildung A) fand sich bei der Orlistat-Probe ein geringer ausgeprägter zytopathischer Effekt als bei der DMSO-Probe. Durch die Zellkernfärbung (Teilabbildungen B) wurden sowohl intakte, als auch dysmorphe, apoptotische Zellkerne sichtbar. Letztere fanden sich bei der Orlistat-Probe seltener, als bei der DMSO-Probe. Auch in Teilabbildung C wurde ein Unterschied ersichtlich: bei der Orlistat-Probe war die Dichte an infizierten, grün-fluoreszierenden Zellen geringer, als bei der DMSO-Probe. Für die Zellkontrollen zeigte sich sowohl nach der Orlistat- als auch nach der DMSO-Behandlung lichtmikroskopisch ein konfluenter Zellrasen (Teilabbildungen A) und in den Teilabbildungen B durchgehend eumorphe Zellkerne.



**Abb. 6.10: Mit Orlistat bzw. DMSO behandelte und mit CVB3-EGFP infizierte (MOI 10) GMK-Zellen 24 h nach Infektion.** Der Zellrasen wurde entweder mit 170 µM Orlistat oder mit DMSO behandelt. Zudem wurde eine nicht infizierte Zellkontrolle mitgeführt. Die Zellen wurden 24 h p. i. fixiert und licht-, sowie fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Die Teilabbildungen A zeigen lichtmikroskopische Aufnahmen, die Teilabbildungen B angefärbte Zellkerne in fluoreszenzmikroskopischer Darstellung und Teilabbildungen C mit EGFP-CVB3 infizierte grün fluoreszierende Zellen. GMK-Zellen, 24 h p. i., Vergrößerung: 200x ; **A:** Lichtmikroskop, **B:** Fluoreszenzmikroskop, Hoechst 33342-Färbung, **C:** Fluoreszenzmikroskop, EGFP-Nachweis.

## 6.3 Phloretin

### 6.3.1 Zytotoxizitätstest für Phloretin mittels WST-1

Zur Feststellung, ob Phloretin zytotoxische Wirkung auf GMK-Zellen zeigt, wurde mit Hilfe eines Spektrometers die metabolische Aktivität der Zellen nach Phloretin-Zugabe bestimmt. Der untenstehenden Tabelle (Tab. 6.2) lassen sich die untersuchten Phloretin-Konzentrationen und die entsprechenden Werte entnehmen. Dabei wurde die Zellvitalität in Prozent der Zellkontrolle angegeben.

**Tab. 6.2: Zellvitalität von GMK-Zellen in Abhängigkeit von der Phloretin-Konzentration.** Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurde zu den Zellkulturen entweder Phloretin in den Konzentrationen 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M oder DMSO zugegeben. Die Zellkontrolle blieb unbehandelt. Nach Zugabe von Cell Proliferation Reagent WST-1 wurde der metabolische Umsatz der Substanz durch ein Spektrometer ermittelt. Die Ergebnisse der Messungen pro Phloretin-Konzentration bzw. für DMSO wurden jeweils gemittelt und ins Verhältnis zur unbehandelten Zellkontrolle gesetzt, um den Einfluss von Phloretin bzw. DMSO auf die Zellvitalität zu bestimmen. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen für die Phloretin-Konzentrationsstufen, sowie für DMSO und die Zellkontrolle.

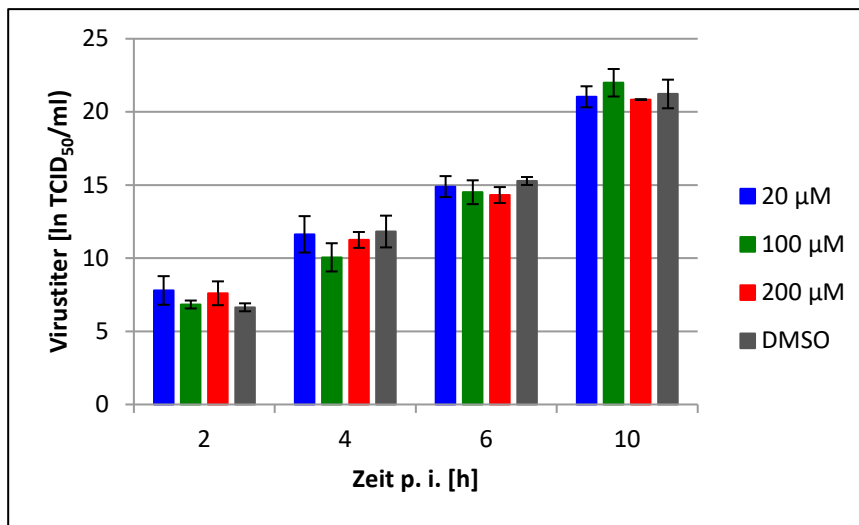
Konzentration ( $\mu$ M)	5	10	20	100	200	DMSO	Zellkontrolle
Zellvitalität (%)	106,08 $\pm$ 0,00	103,38 $\pm$ 3,70	100,03 $\pm$ 3,59	101,00 $\pm$ 2,83	99,63 $\pm$ 2,62	102,82 $\pm$ 2,02	100,00 $\pm$ 0,00

Die Zellvitalität lag bei allen untersuchten Phloretin-Konzentrationen annähernd bei 100 %. Phloretin wies bei den verwendeten Konzentrationen also keinen zytotoxischen Einfluss auf GMK-Zellen auf. Auch das als Lösungsmittel verwendete DMSO beeinflusste die Zellen nicht negativ.

### 6.3.2 Einfluss der Fettsäureaufnahme-Inhibition mittels Phloretin auf die Virusreplikation

Im Folgenden sollte der Einfluss der Hemmung der Fettsäureaufnahme aus dem Extrazellularraum durch Phloretin auf die Virusreplikation untersucht werden. Um eine ausreichende Abschirmung der Zelle gegen Fettsäuren aus dem Extrazellularraum zu erreichen, wurde Phloretin 1 h vor Infektion zugegeben. Es wurden dazu die Phloretin-Konzentrationen 20  $\mu$ M, 100  $\mu$ M und 200  $\mu$ M verwendet. Eine DMSO- (mit DMSO vorbehandelt und mit CVB3 infiziert) und eine Zellkontrolle (unbehandelt, nicht infiziert) wurden vergleichend mitgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte getrennt für den Intra- und den Extrazellularraum. Intrazellulär zeigte sich ein Titeranstieg im Zeitverlauf (2 h p. i. bis 10 h p. i.). Dabei fiel der Anstieg für die Phloretin-Proben unwesentlich flacher aus, als für die DMSO-Proben und auch ein konzentrationsabhängiger Einfluss auf die Höhe

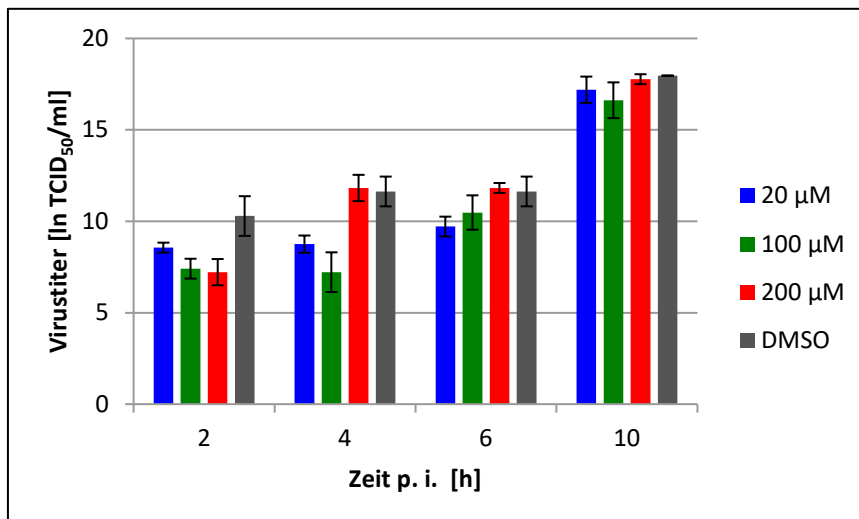
des Titters konnte nicht festgestellt werden (Abb. 6.11) Der  $IC_{50}$  ließ sich für Phloretin nicht ermitteln, da keine Konzentrationsabhängigkeit bestand.



**Abb. 6.11: Intrazellulärer Virustiter 2 h, 4 h, 6 h und 10 h nach Infektion mit CVB3.** Die Phloretin-Zugabe erfolgte 1 h vor der Infektion mit CVB3 (MOI 10). Es wurden die Phloretin-Konzentrationen 20 µM, 100 µM und 200 µM verwendet, sowie eine Kontrolle, zu der anstelle von Phloretin lediglich DMSO hinzugegeben wurde. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der

Überstand entfernt und durch mehrmaliges Gefriertauen das intrazelluläre Virus freigesetzt. Der Virustiter wurde mittels  $TCID_{50}$ -Test ermittelt. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD aus je drei Proben/Zeitpunkt für die verwendeten Phloretin-Konzentrationen und die DMSO-Kontrolle.

Der extrazelluläre Titer stieg im Zeitraum von 2 h p. i. bis 10 h p. i. an (Abb. 6.12). Dabei zeigte sich allgemein, dass nach einer Behandlung mit Phloretin der Titeranstieg flacher verlief, als nach DMSO-Behandlung.



**Abb. 6.12: Extrazellulärer Virustiter 2 h, 4 h, 6 h und 10 h nach Infektion mit CVB3.** Die Phloretin-Zugabe erfolgte 1 h vor der Infektion mit CVB3 (MOI 10). Es wurden die Phloretin-Konzentrationen 20 µM, 100 µM und 200 µM verwendet, sowie eine DMSO-Kontrolle. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der Überstand gewonnen und der Virustiter mittels

$TCID_{50}$ -Test ermittelt. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD aus je drei Proben/Zeitpunkt für die verwendeten Phloretin-Konzentrationen und die DMSO-Kontrolle.

Nach 10 h p. i. hatten sich die Werte jedoch wieder angenähert (20 µM: ln (17,20/ml); 100 µM: ln (16,62/ml); 200 µM: ln (17,77/ml); DMSO: ln (17,96/ml)).

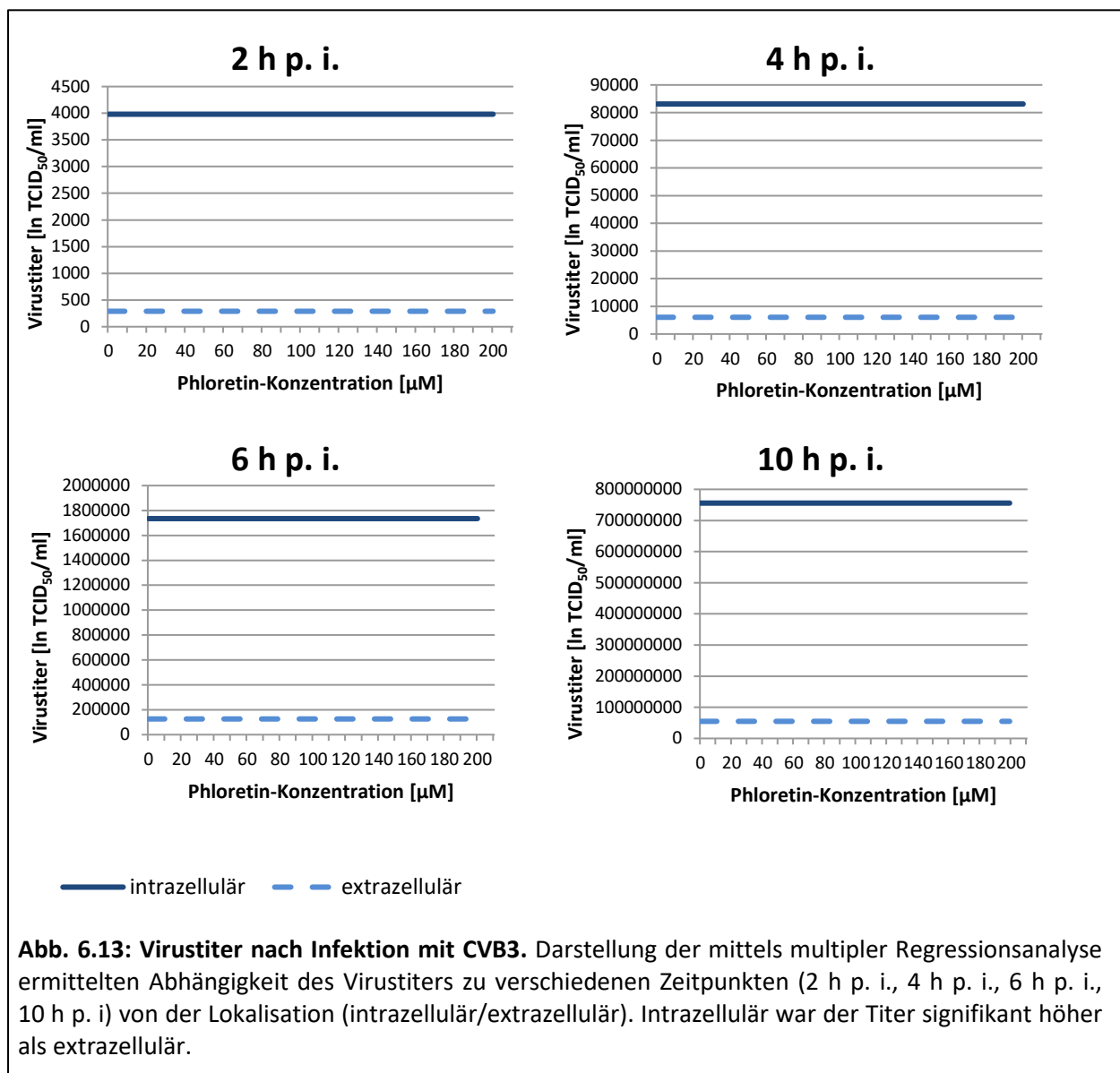


Eine Konzentrationsabhängigkeit konnte nur 2 h p. i. festgestellt werden: Nach Gabe von 200  $\mu\text{M}$  Phloretin lag der Titer deutlich unter dem nach Gabe von 100  $\mu\text{M}$  bzw. 20  $\mu\text{M}$  Phloretin. Nach 4 h konnte diese Abhängigkeit nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 6.12).

Um die statistische Signifikanz der Ergebnisse beurteilen zu können, wurde eine multiple Regressionsanalyse durchgeführt (Abb. 6.13). Dabei wurden die Phloretin-Konzentrationen bzw. DMSO (=Konzentration 0), die Lokalisation (intrazellulär/extrazellulär), sowie der Zeitpunkt nach Infektionsbeginn (2 h p. i., 4 h p. i., 6 h p. i., 10 h p. i.) hinsichtlich ihres Einflusses auf den Virustiter untersucht:

$$\ln(V) = 3,94021 + 1,51924 \cdot t - 1,31077 \cdot \text{Ort} \quad R^2 = 92,08; \text{Pr} > F < 0,0001; n = 93;$$

Mit Virustiter (V), Untersuchungszeitpunkt (t) und Lokalisation (Ort).

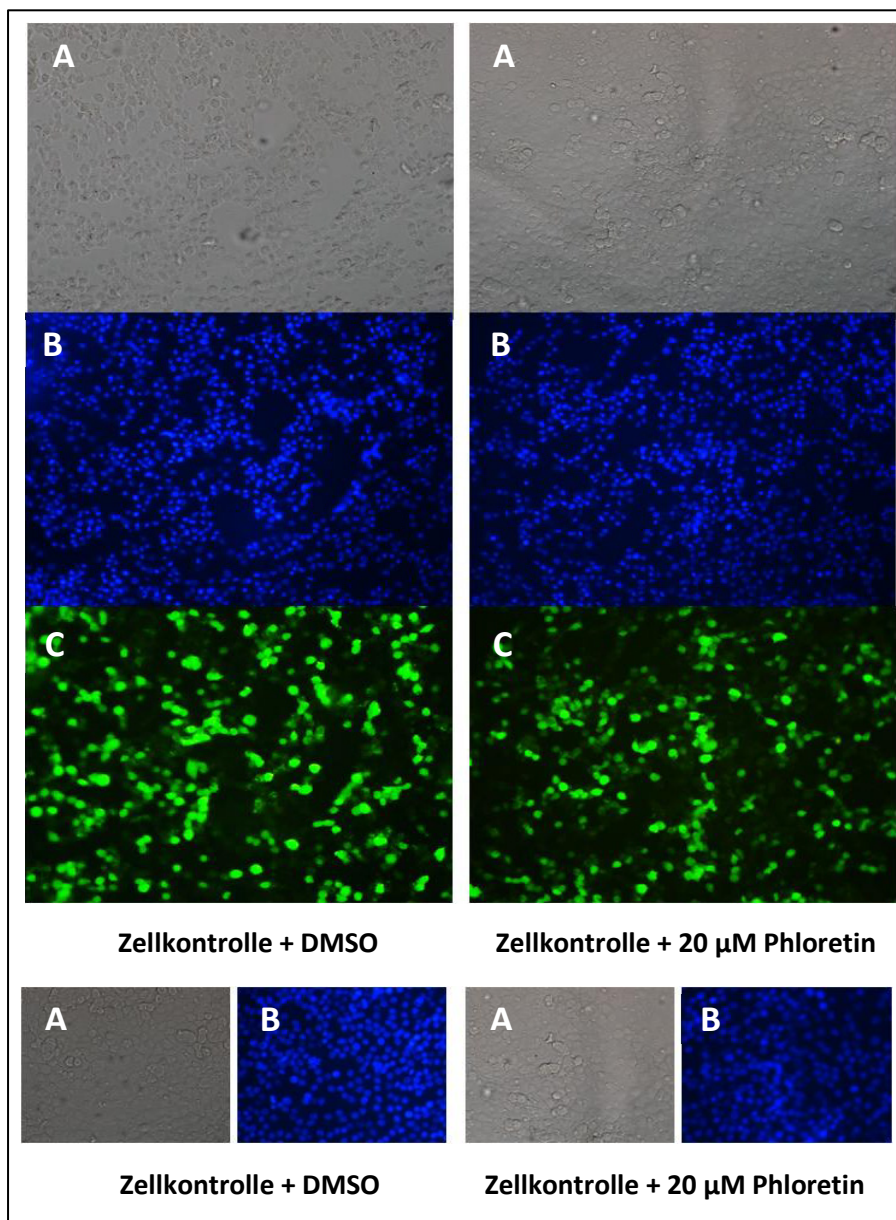




Die Kurve in Abb. 6.13 verläuft für alle Phloretin-Konzentrationen und DMSO (Phloretin-Konzentration=0) als Gerade, was verdeutlicht, dass der Einfluss der Phloretin-Konzentration auf die Höhe des Virustiters nicht signifikant war. Dies gilt für alle Zeitpunkte (2 h p. i., 4 h p. i., 6 h p. i., 10 h p. i.). Die Lokalisation (intrazellulär/extrazellulär) erwies sich hingegen als signifikanter Einflussfaktor auf die Titerhöhe. Intrazellulär wurden signifikant höhere Titer ermittelt, als extrazellulär.

### 6.3.2 CVB3-EGFP und Phloretin

Wie bei Orlistat sollte auch bei Phloretin ein optischer Nachweis der Virusreplikation mit CVB3-EGFP erfolgen (Abb. 6.14).



**Abb. 6.14: Mit Phloretin bzw. DMSO behandelte und mit CVB3-EGFP infizierte (MOI 10) GMK-Zellen 24 h nach Infektion.** Der Zellrasen wurde entweder mit 20 µM Phloretin oder mit DMSO behandelt. Zudem wurde eine nicht infizierte Zellkontrolle mitgeführt. Die Zellen wurden 24 h p. i. fixiert und licht-, sowie fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Die Teilabbildungen A zeigen lichtmikroskopische Aufnahmen, die Teilabbildungen B angefärbte Zellkerne in fluoreszenzmikroskopischer Darstellung und Teilabbildungen C mit CVB3-EGFP infizierte grünfluoreszierende Zellen. GMK-Zellen, 24 h p. i., Vergrößerung: 200x ; **A:** Lichtmikroskop, **B:** Fluoreszenzmikroskop, Hoechst 33342Färbung, **C:** Fluoreszenzmikroskop, EGFP-Nachweis.

Dazu wurden GMK-Zellen 1 h vor Infektionsbeginn mit 20  $\mu\text{M}$  Phloretin behandelt und der Zellrasen nach 24 h auf Deckgläschen fixiert. Zudem wurde eine Kontrolle mitgeführt, zu der 1 h vor Infektion nur DMSO hinzugegeben wurde, sowie eine Zellkontrolle, die mit Phloretin bzw. DMSO behandelt, aber nicht infiziert wurde. Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop.

Abbildung 6.14 zeigt GMK-Zellen 24 h nach Infektion mit CVB3-EGFP. In den Teilabbildungen A sind lichtmikroskopische Aufnahmen des Zellrasens dargestellt. Nach 24 h war die Konfluenz des Zellrasens sowohl nach Phloretin-Gabe als auch nach DMSO-Gabe aufgehoben. In der Zellkernfärbung (Teilabbildungen B) zeigten sich eine Vielzahl an kondensierten Kernen, unabhängig davon, ob die Zellen mit Phloretin oder DMSO vorbehandelt worden waren. Auch in der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme (Teilabbildungen C) zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich der Anreicherung von EGFP in infizierten Zellen. Die Zellkontrollen wiesen bei beiden Substanzen einen konfluenten Zellrasen und intakte Kerne auf.

## 6.4 Orlistat und Phloretin

### 6.4.1 Zytotoxizitätstest für Orlistat + Phloretin mittels WST-1

Um durch die Kombination beider Substanzen auftretende zytotoxische Eigenschaften auszuschließen, wurde die Zellvitalität nach Zugabe von Orlistat und Phloretin bestimmt. Dabei wurden jeweils die Konzentrationen, die für die Behandlung der CVB3-EGFP infizierten Zellen verwendet worden waren, untersucht (170  $\mu\text{M}$  Orlistat und 20  $\mu\text{M}$  Phloretin). Hierbei zeigte sich lediglich ein geringfügiger Rückgang der metabolischen Aktivität der Zellen unter Einfluss von Orlistat und Phloretin. Der  $\text{IC}_{50}$  konnte wegen der unendlich großen Anzahl an Kombinationsmöglichkeiten der beiden Substanzen nicht berechnet werden. Nachstehende Tabelle (Tab. 6.3) zeigt die Ergebnisse der Messungen in Prozent zur Zellkontrolle.

**Tabelle 6.3: Zellvitalität von GMK-Zellen nach Orlistat- und Phloretin-Gabe.** Zu den Zellkulturen wurde nach 48 h Inkubationszeit entweder Orlistat (170  $\mu\text{M}$ ) und Phloretin (20  $\mu\text{M}$ ) oder DMSO zugegeben. Die Zellkontrolle blieb unbehandelt. Nach Zugabe von Cell Proliferation Reagent WST-1 wurde der metabolische Umsatz der Substanz spektrometrisch bestimmt. Die Ergebnisse der Messungen für Orlistat-Phloretin bzw. für DMSO wurden jeweils gemittelt und ins Verhältnis zur unbehandelten Zellkontrolle gesetzt, um den Einfluss der Kombination aus Orlistat und Phloretin bzw. DMSO auf die Zellvitalität zu bestimmen. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

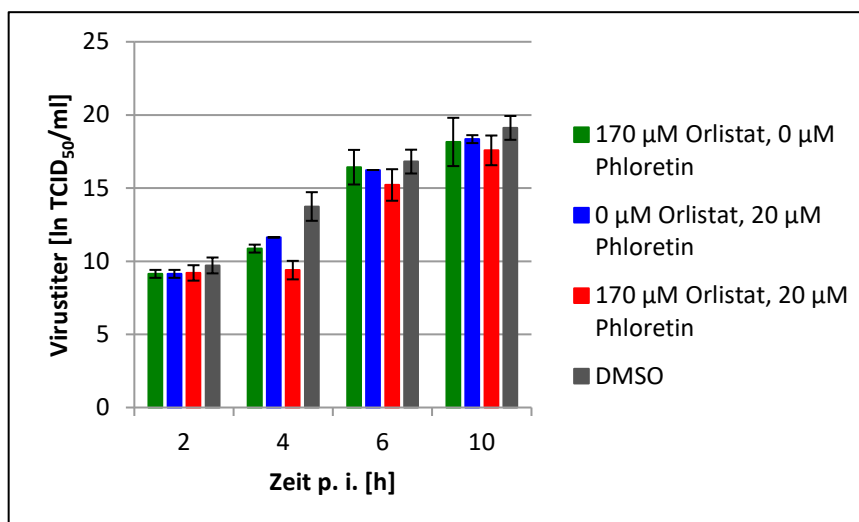
	Orlistat 170 $\mu\text{M}$ und Phloretin 20 $\mu\text{M}$	DMSO	Zellkontrolle
Zellvitalität (%)	85,97 $\pm$ 18,83	92,3 $\pm$ 10,45	100,0 $\pm$ 0,00

Die Zellvitalität lag bei der untersuchten Kombination aus 170  $\mu\text{M}$  Orlistat und 20  $\mu\text{M}$  Phloretin ebenso wie die DMSO-Probe geringfügig unter der der Zellkontrolle. Es konnte kein zytotoxischer Einfluss auf GMK-Zellen abgeleitet werden.

#### 6.4.2 Einfluss von Fettsäuresynthase-Inhibition mittels Orlistat und Fettsäureaufnahme-Inhibition mittels Phloretin auf die Virusreplikation

Als Ergänzung zu den einzelnen Versuchen zur Wirkung von Orlistat bzw. Phloretin wurden die beiden Substanzen als Kombination (170  $\mu\text{M}$  Orlistat und 20  $\mu\text{M}$  Phloretin) verwendet und ihr Einfluss auf die Virusreplikation untersucht. Die Zugabe erfolgte 1 h vor Infektion. Als Vergleich wurde eine Zellkultur lediglich mit 170  $\mu\text{M}$  Orlistat versehen, weitere mit 20  $\mu\text{M}$  Phloretin bzw. DMSO. Die Zellkontrolle blieb unbehandelt und nicht infiziert. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte getrennt für Intra- und Extrazellularraum. Auf Grund der unendlichen Zahl an Kombinationsmöglichkeiten unterschiedlicher Konzentrationen der beiden Stoffe, war es nicht möglich, den  $\text{IC}_{50}$  zu errechnen.

Intrazellulär stieg der Titer bei allen Proben im Zeitverlauf (2 h p. i. bis 10 h p. i.) an, unabhängig von der zugegebenen Substanz. Es zeigte sich jedoch, dass der Anstieg für die mit Orlistat und/oder Phloretin vorbehandelten Proben flacher ausfiel, als nach DMSO-Vorbehandlung. Nach der kombinierten Gabe von Orlistat und Phloretin waren die Titer durchgehend am niedrigsten. (Abb. 6.15).

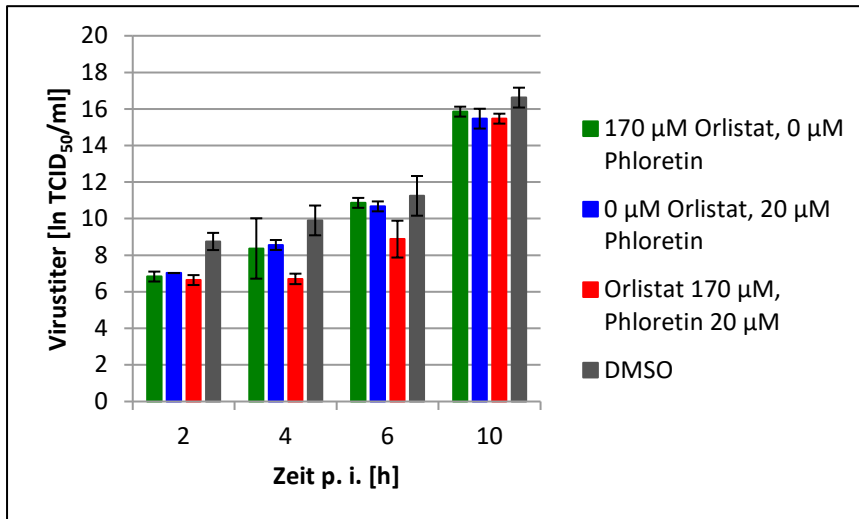


**Abbildung 6.15:** Intrazellulärer Virustiter 2 h, 4 h, 6 h und 10 h nach Infektion mit CVB3. Die Substanz-Zugabe erfolgte 1 h vor der Infektion mit CVB3 (MOI 10). Es wurden 170  $\mu\text{M}$  Orlistat, 20  $\mu\text{M}$  Phloretin sowie die Kombination beider Präparate verwendet. Eine DMSO-Kontrolle wurde vergleichend mitgeführt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der Über-

stand gewonnen und durch mehrmaliges Gefriertauen das intrazelluläre Virus freigesetzt. Der Virustiter wurde mittels  $\text{TCID}_{50}$ -Test ermittelt. Dargestellt sind die  $\text{MW} \pm \text{SD}$ .

Die extrazellulär ermittelten Titer lagen unter den Intrazellulären (Abb. 6.16). Auch hier war ein kontinuierlicher Titeranstieg im Zeitraum von 2 h p. i. bis 10 h p. i. zu verzeichnen, der

unabhängig von der zugegebenen Substanz erfolgte. Nach DMSO-Behandlung erreichte der Titer die größte Höhe. Die gemeinsame Gabe von Orlistat und Phloretin wirkte sich negativ auf die Virusvermehrung aus und führte so zu niedrigeren Titern, als die Behandlung mit nur einer Substanz.



**Abbildung 6.16: Extrazellulärer Virustiter 2 h, 4 h, 6 h und 10 h nach Infektion mit CVB3.** Die Substanz-Zugabe erfolgte 1 h vor der Infektion mit CVB3 (MOI 10). Es wurden 170 µM Orlistat, 20 µM Phloretin sowie die Kombination beider Präparate verwendet. Eine DMSO-Kontrolle wurde vergleichend mitgeführt. Der Virustiter wurde mittels TCID<sub>50</sub>-Test ermittelt. Dargestellt sind die MW ± SD.

Die statistische Auswertung mittels multipler Regressionsanalyse ergab einen signifikanten Einfluss der Orlistat- und Phloretin-Konzentration, des Untersuchungszeitpunktes, sowie der Lokalisation (intrazellulär/extrazellulär):

$$\ln(V) = 6,74431 + 1,14568 \cdot t - 0,04509 \cdot P_{\text{Konz}} - 0,00604 \cdot O_{\text{Konz}} - 1,58181 \cdot \text{Ort}$$

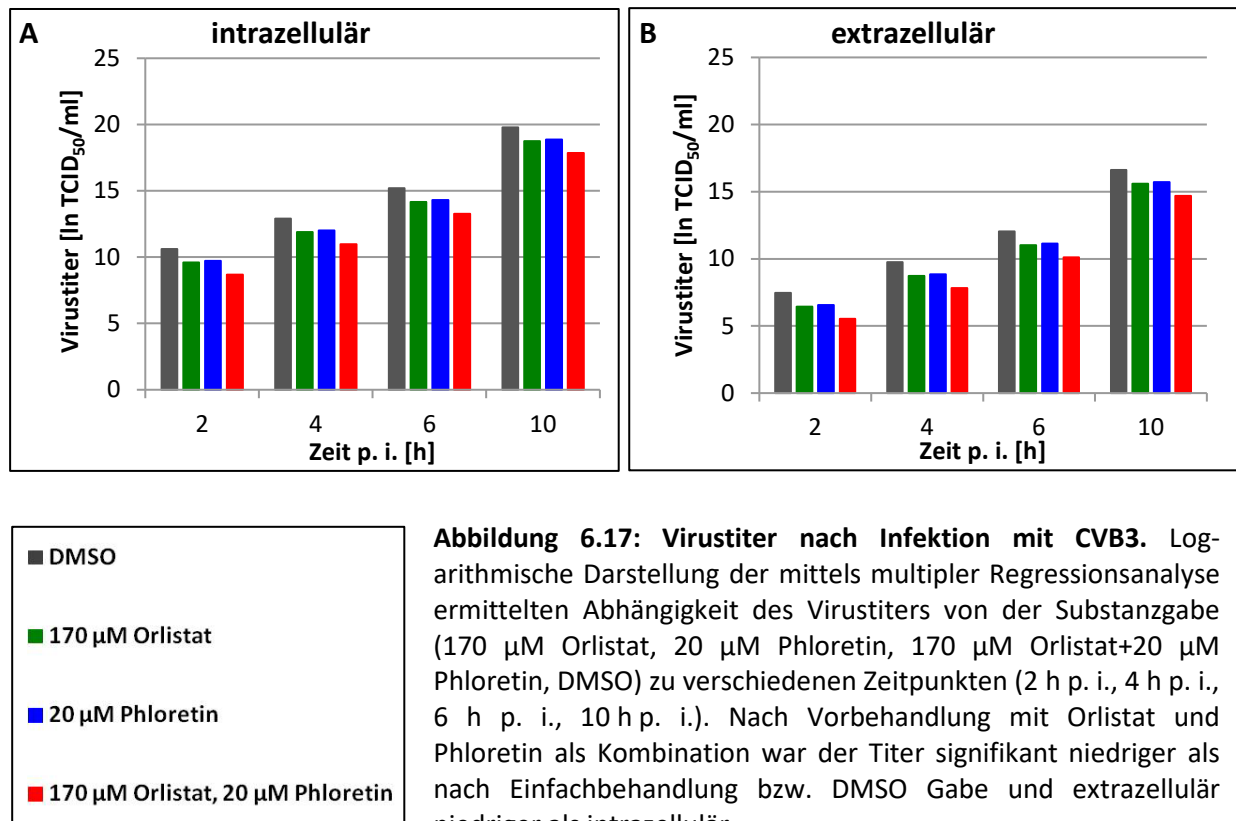
$$R^2=91,65; \text{Pr}>F<0,0001; n=138;$$

Mit Virustiter (V), Untersuchungszeitpunkt (t), Phloretin-Konzentration ( $P_{\text{Konz}}$ ), Orlistat-Konzentration ( $O_{\text{Konz}}$ ), und Lokalisation (Ort).

Die Wechselwirkung zwischen Orlistat und Phloretin hatte dabei einen geringen Einfluss auf das Bestimmtheitsmaß.

Wegen der besseren graphischen Darstellbarkeit wurden für die Abbildungen 6.17 A und 6.17 B logarithmische Skalierungen gewählt. Aus den Abbildungen geht hervor, dass der Titer nach Gabe beider Substanzen signifikant niedriger war als nach Gabe von lediglich Orlistat oder Phloretin bzw. DMSO. Größeren Einfluss auf den Virustiter hatte der Untersuchungszeitpunkt (2 h p. i., 4 h p. i., 6 h p. i., 10 h p. i.): mit zunehmender Zeit p.i. stieg die Virenlast signifikant an.

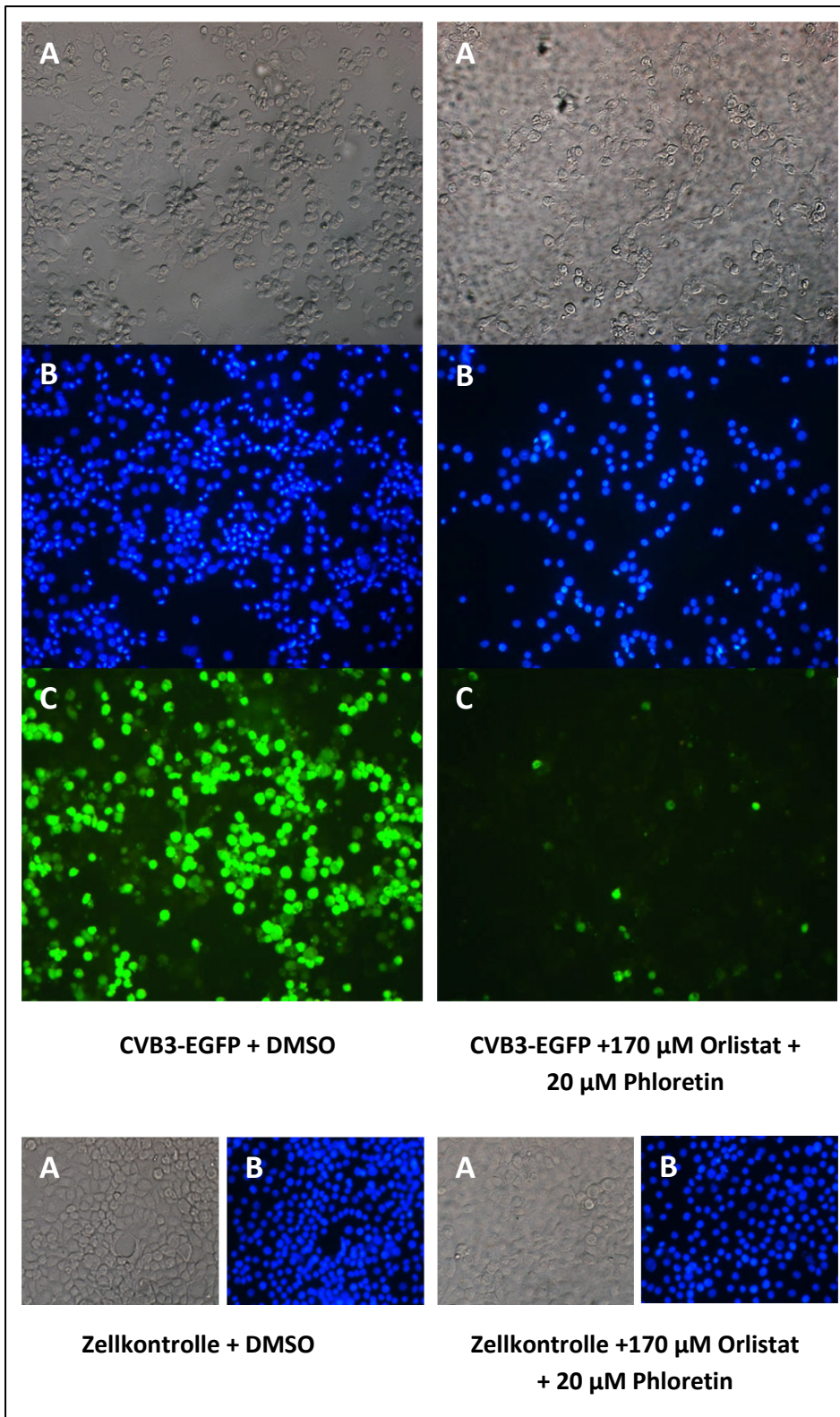
Abbildung 6.17 A und 6.17 B vergleichend wird deutlich, dass auch die Lokalistaion statistisch relevant war für die Höhe des Virustiters: Die intrazelluläre Virenlast lag signifikant über der extrazellulären.



#### 6.4.3 CVB3-EGFP und Orlistat + Phloretin

Nach der mikroskopischen Illustration der Wirkung von Orlistat bzw. Phloretin auf CVB3-EGFP-infizierte GMK-Zellen sollte auch der Einfluss der Wirkstoffkombination mikroskopisch untersucht werden. Dazu wurden GMK-Zellen 1 h vor Infektionsbeginn mit 170 µM Orlistat und 20 µM Phloretin behandelt und der Zellrasen nach 24 h fixiert. Zudem wurde eine Kontrolle mitgeführt, zu der 1 h vor Infektion nur DMSO hinzugegeben wurde, sowie eine Zellkontrolle, die nicht behandelt und nicht infiziert wurde (Abb. 6.18). Die Teilabbildungen A zeigen lichtmikroskopische Aufnahmen des Zellrasens. Nach DMSO-Gabe war 24 h p. i. die Integrität des Zellrasens zerstört. In der Zellkernfärbung (Teilabbildungen B) imponierten eine Vielzahl an kondensierten Kernen. Auch in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (Teilabbildungen C) zeigte sich deutlich die Infektion der GMK-Zellen mit CVB3-EGFP durch die massive Anreicherung des fluoreszierenden Proteins in den Zellen.





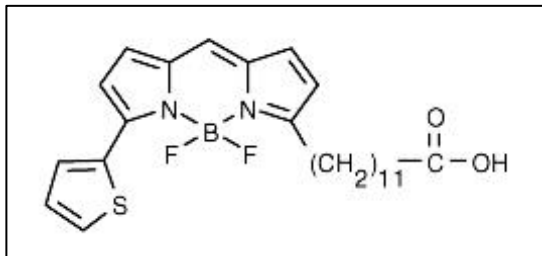
**Abbildung 6.18:** Mit Orlistat + Phloretin bzw. DMSO behandelte und mit CVB3EGFP infizierte (MOI 10) GMK-Zellen 24 h nach Infektion. Die Zellen wurden entweder mit 170 µM Orlistat + 20 µM Phloretin oder mit DMSO behandelt. Die Zellkontrolle wurde nicht infiziert. Die Zellen wurden 24 h p. i. fixiert und licht- sowie fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Die Teilabbildungen A zeigen lichtmikroskopische Aufnahmen, die Teilabbildungen B angefärbte Zellkerne in fluoreszenzmikroskopischer Darstellung und Teilabbildungen C mit EGFP-CVB3 infizierte grün-fluoreszierende Zellen. GMK-Zellen, 24 h p. i., Vergrößerung: 200x; **A:** Lichtmikroskop, **B:** Fluoreszenzmikroskop, Hoechst 33342-Färbung, **C:** Fluoreszenzmikroskop, EGFP-Nachweis.

Nach der Gabe von Orlistat und Phloretin fiel ein weitestgehend intakter Zellrasen auf (Teilabbildungen A). Teilabbildungen B demonstrierten die geringe Anzahl an fragmentierten Zellkernen. Auch die Anreicherung von EGFP in den Zellen fiel deutlich geringer aus als bei

den DMSO-Proben (Teilabbildungen C). Die Zellkontrollen zeigten sowohl nach DMSO- als auch nach Orlistat- und Phloretin-Gabe keine Infektionszeichen.

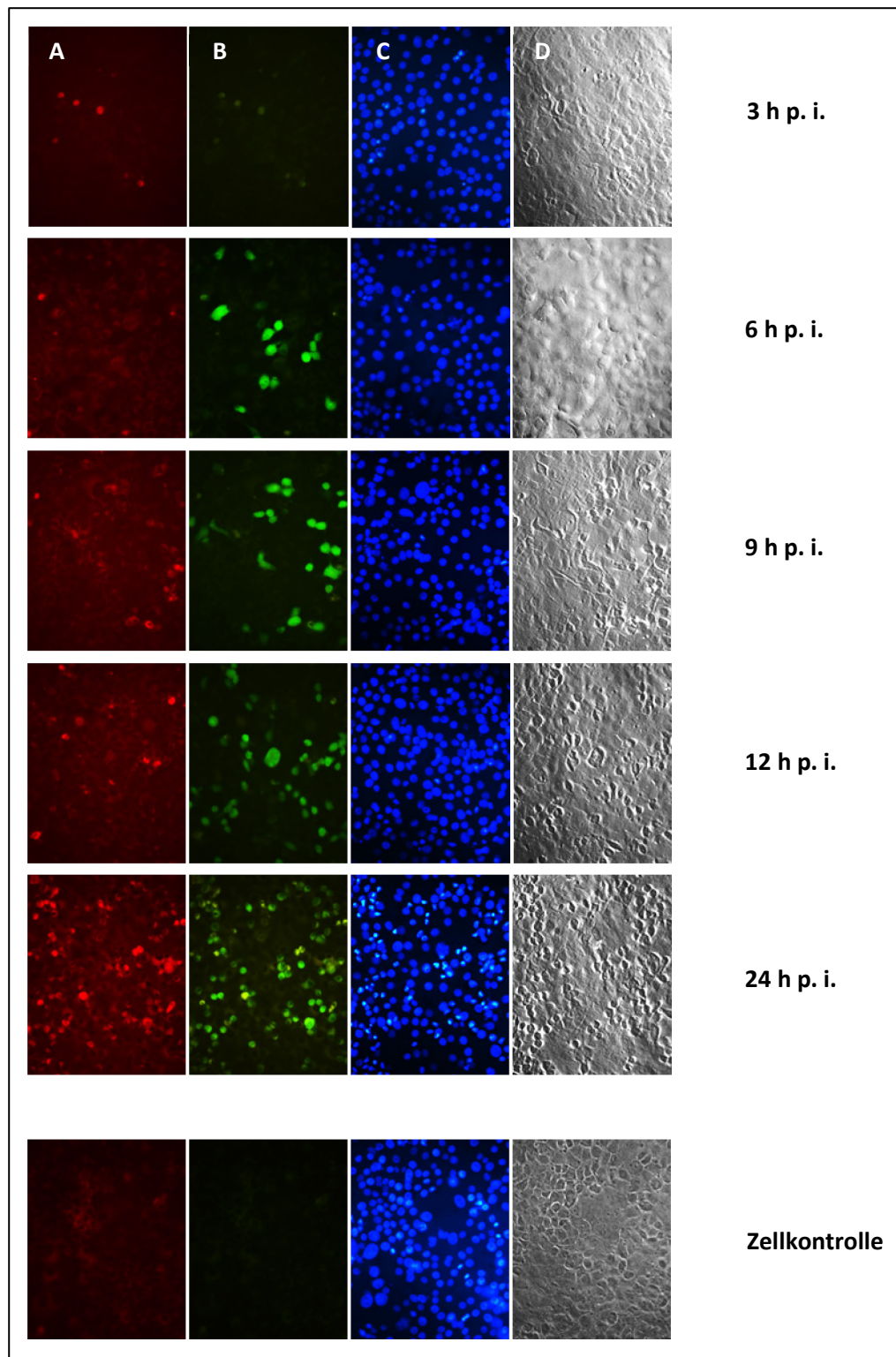
## 6.5 Nachweis der Fettsäureaufnahme mit Bodipy

Um den Einfluss von Orlistat und Phloretin auf den Fettstoffwechsel der Zellen optisch nachzuweisen, wurde vor der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung eine Färbung der Präparate mit Bodipy 558/568 durchgeführt. Der rote Farbstoff ist ein Fettsäureanalogon, welches zusammen mit freien Fettsäuren aus dem Extrazellularraum in die Zellen aufgenommen wird (Abbildung 6.19). Im Fluoreszenzmikroskop leuchtet die Substanz hellrot (Li *et al.* 2008, Viktorova *et al.* 2014).



**Abbildung 6.19: Strukturformel Bodipy® 558/568**  
(Molecular Probes 2015)

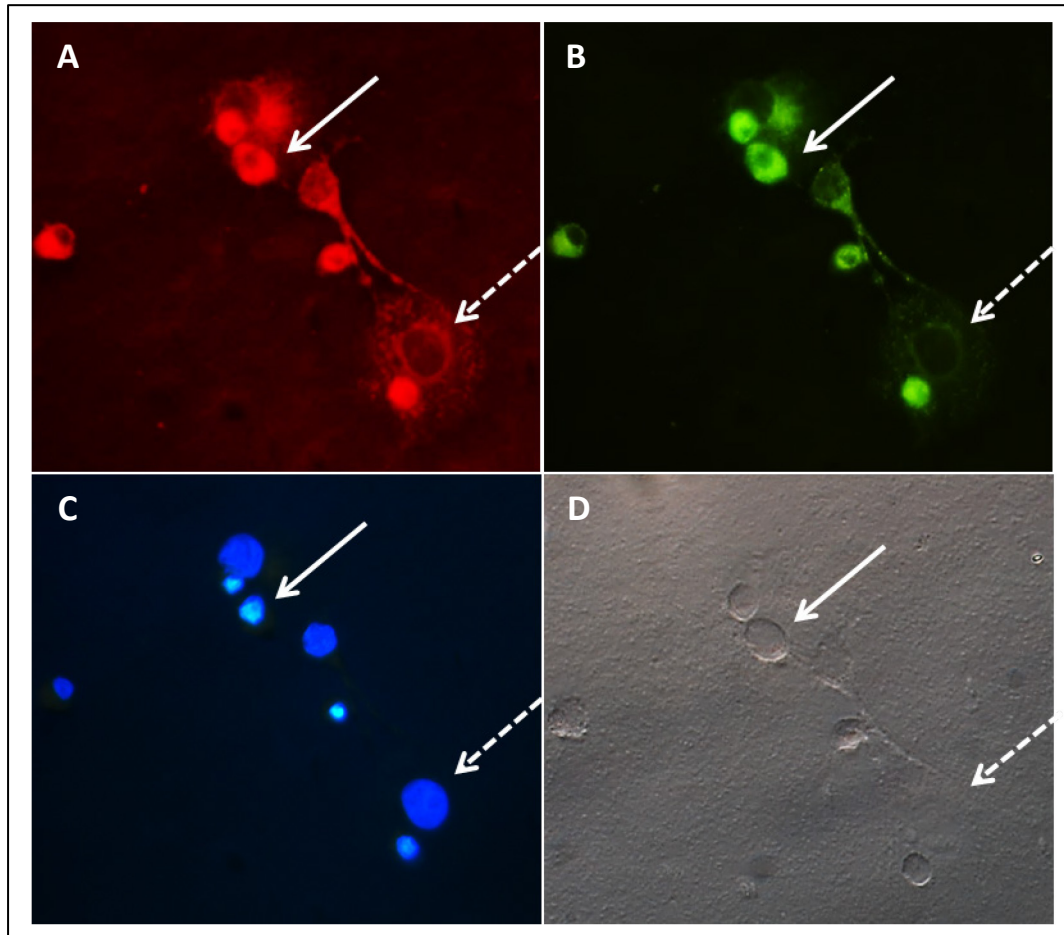
Abbildung 6.20 stellt den Infektionsverlauf über 24 h dar. Dabei zeigte sich, dass abhängig von der Zeit (3 h p. i., 6 h p. i., 9 h p. i., 12 h p. i. und 24 h p. i.) die Zahl der CVB3-EGFP-infizierten Zellen zunahm (Teilabbildungen B). In gleichem Maße nahmen die Zerstörung des konfluenten Zellrasens (Teilabbildungen D) und die Fragmentierung der Zellkerne (Teilabbildungen C) zu. Bei der Untersuchung der Fettsäureaufnahme aus dem Extrazellularraum mittels Bodipy ließ sich eine zunehmende Anreicherung von Fettsäuren in den infizierten Zellen beobachten (Teilabbildungen A).



**Abbildung 6.20: Zunahme der CVB3-EGFP infizierten Zellen in Abhängigkeit von der Zeit.** Der Zellrasen wurde mit CVB3-EGFP (MOI 100) infiziert. Zudem wurde eine nicht infizierte Zellkontrolle mitgeführt. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeiten fixiert und licht- sowie fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Die Teilabbildung A zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Färbung mit Bodipy, die Teilabbildung B mit CVB3-EGFP infizierte grün-fluoreszierende Zellen, Teilabbildung C angefärbte Zellkerne in fluoreszenzmikroskopischer Darstellung und Teilabbildung D lichtmikroskopische Aufnahmen. GMK-Zellen, 24 h p. i., Vergrößerung: 200x; **A:** Fluoreszenzmikroskop, Bodipyfärbung, **B:** Fluoreszenzmikroskop, EGFP-Nachweis, **C:** Fluoreszenzmikroskop, Hoechst 33342-Färbung **D:** Lichtmikroskop



In der Detailaufnahme (Abb. 6. 21) wurde durch die Bodipy-Färbung (Teilabbildung A) die Ansammlung von Fettsäuren in der infizierten Zelle (durchgehender Pfeil) deutlich. In der nicht infizierten Zelle (unterbrochener Pfeil) fand keine Anreicherung von Fettsäuren aus dem Extrazellularraum statt.

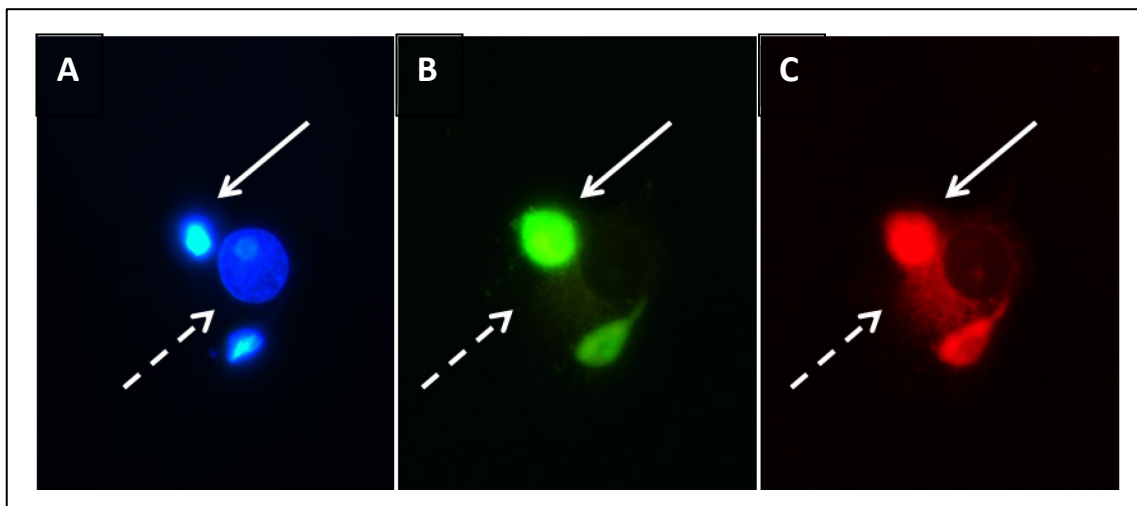


**Abbildung 6.21: Detailaufnahme virusinfizierter und nicht infizierter Zellen 24 h p. i.** In Teilabbildung A zeigt sich eine deutliche Anreicherung von Fettsäuren im Intrazellularraum in der infizierten Zelle (durchgehender Pfeil). In der nicht infizierten Zelle (unterbrochener Pfeil) fiel die Rotfärbung geringer aus, da hier keine Fettsäuren angereichert wurden. Teilabbildung B demonstriert die Infektion mit CVB3-EGFP (durchgehender Pfeil) bzw. die nicht infizierte Zelle (unterbrochener Pfeil). Mittels Zellkernfärbung wurde in Teilabbildung C die Zellkerne infizierter (durchgehender Pfeil, kondensierter Zellkern) und nicht infizierter Zellen (unterbrochener Pfeil, intakter Kern) verglichen. In den lichtmikroskopischen Aufnahmen (Teilabbildung D) fiel die infizierte Zelle durch ihre Abrundung auf (durchgehender Pfeil), die nicht infizierte Zelle hob sich nicht von der Ebene ab (unterbrochener Pfeil). Vergrößerung: 400x, **A:** Fluoreszenzmikroskop, Bodipy-Färbung, **B:** Fluoreszenzmikroskop, EGFP-Nachweis, **C:** Fluoreszenzmikroskop, Hoechst 33342-Färbung, **D:** Lichtmikroskop

Aus der Teilabbildung B wird ersichtlich, dass es sich bei der in Teilabbildung A stark rot gefärbten Zelle um eine infizierte Zelle handelte (durchgehender Pfeil). Sie fluoreszierte durch die Replikation von CVB3-EGFP im Gegensatz zur nicht infizierten Zelle (unterbrochener Pfeil) deutlich grün. Durch die Zellkernfärbung in Teilabbildung C wurde die

unterschiedliche Struktur des Zellkerns der gesunden Zelle (unterbrochener Pfeil) und der infizierten Zelle (durchgehender Pfeil) deutlich: Der Kern der nicht infizierten Zelle war abgerundet und intakt, der der infizierten Zelle kondensiert. In der lichtmikroskopischen Aufnahme (Teilabbildung D) imponierte die infizierte Zelle (durchgehender Pfeil) deutliche Abgerundet, während sich die nicht infizierte Zelle (unterbrochener Pfeil) nicht von der Ebene des Zellrasens abhob.

In einer höheren Vergrößerung (Abb. 6.22) zeigte sich besonders deutlich die erhöhte Fettsäureaufnahme (Teilabbildung C, durchgehender Pfeil). Die Zelle imponierte in Teilabbildung B durch die Anreicherung von EGFP grün fluoreszierend (durchgehender Pfeil). Aus Teilabbildung A wurde ersichtlich, dass der Zellkern der infizierten Zelle (durchgehender Pfeil) in kondensierter Form vorlag. Die unterbrochenen Pfeile markieren im Vergleich dazu eine nicht infizierte Zelle. Die in Teilabbildung A so markierte Zelle (intakter Kern) weist in den Teilabbildungen B und C keine Anreicherung von EGFP oder Fettsäuren auf.

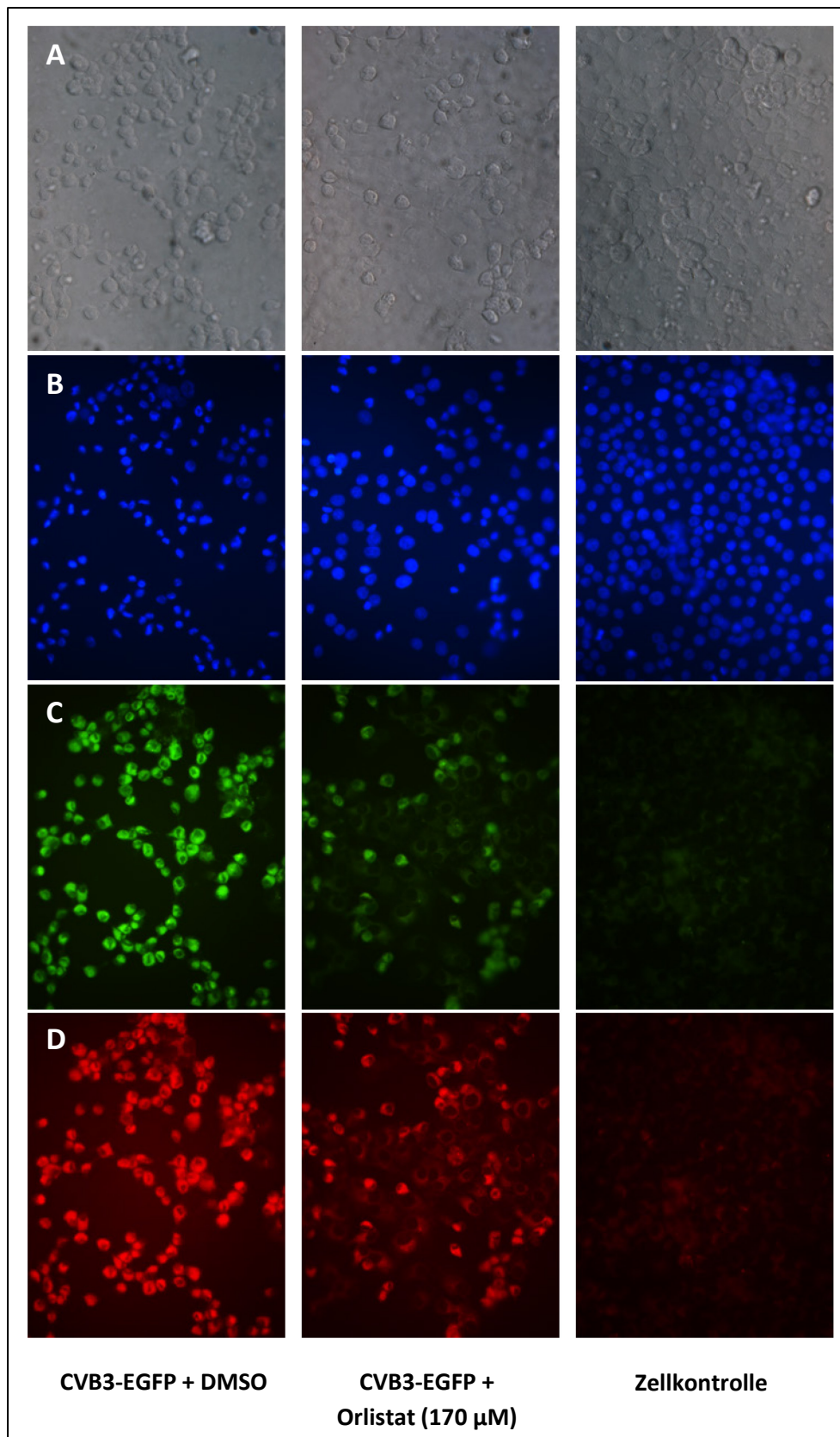


**Abbildung 6.22: Fettsäureaufnahme in CVB3-EGFP infizierte Zellen.** In der durch die Infektion mit CVB3-EGFP grün-fluoreszierenden Zelle (Teilabbildung B) zeigte sich eine vermehrte Anreicherung von Fettsäuren (Teilabbildung C). Der Zellkern der infizierten Zelle war kondensiert (Teilabbildung A). Die unterbrochenen Pfeile markieren im Vergleich dazu eine nicht infizierte Zelle. 24 h p. i. Vergrößerung: 630x **A:** Fluoreszenzmikroskop, Hoechst 33342-Färbung **B:** Fluoreszenzmikroskop, EGFP-Nachweis **C:** Fluoreszenzmikroskop, Bodipy-Färbung

### 6.5.1 Nachweis der Fettsäureaufnahme mittels Bodipy nach Orlistat-Applikation

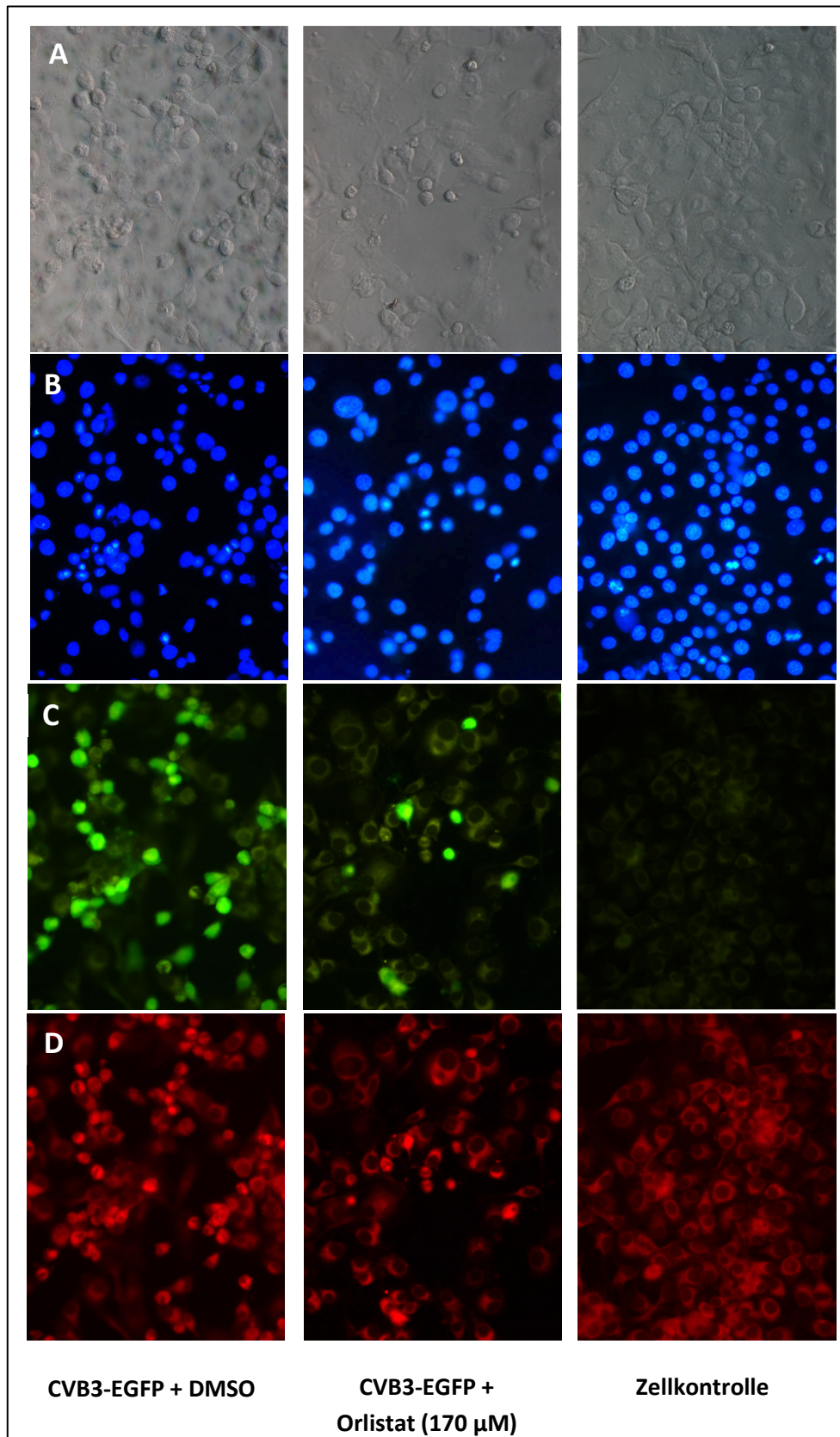
Ob Orlistat einen Einfluss auf die Fettsäureaufnahme hat, wurde im Folgenden untersucht (Abb. 6.23). Dazu wurden GMK-Zellen, die entweder mit Orlistat (170  $\mu$ M) oder mit DMSO 1 h vor Infektion mit CVB3-EGFP vorbehandelt worden waren, verglichen. Eine nicht infizierte Zellkontrolle wurde mitgeführt. Zunächst wurden der Zellrasen lichtmikroskopisch auf zyotoxische Effekte untersucht, mittels Zellkernfärbung die Kernmorphologie der Zellen

fluoreszenzmikroskopisch ermittelt und die Anreicherung von EGFP in den Zellen analysiert. In einem letzten Schritt konnte mittels Bodipy die Fettsäureaufnahme in infizierte Zellen dargestellt werden. Bei der DMSO-Kontrolle zeigten sich ein diskontinuierlicher Zellrasen (Teilabbildungen A), eine Vielzahl von fragmentierten Zellkernen (Teilabbildungen B) und grün-fluoreszierenden Zellen (Teilabbildungen C). Zudem wurde eine leuchtende Rotfärbung der infizierten Zellen sichtbar (Teilabbildungen D). Sie deutete auf eine erhöhte Fettsäureaufnahme aus dem Extrazellularraum in die infizierten Zellen hin. Bei der Orlistat-Kontrolle waren die Ausprägungen der lichtmikroskopisch beurteilten Zellrasenveränderungen (Teilabbildungen A), der Zellkernfragmentierung (Teilabbildungen B) und die Anzahl der mit CVB3-EGFP-infizierten Zellen (Teilabbildungen C) in deutlich vermindertem Maß vorhanden. Die Fettsäureaufnahme in infizierte Zellen wurde durch Orlistat jedoch nicht reduziert (Teilabbildungen D). Orlistat hemmte also die Virusreplikation, was sich in einer geringeren Anzahl an grün fluoreszierenden Zellen widerspiegelte. Die Fettsäureaufnahme in infizierte Zellen blieb dahingegen unbeeinflusst. Bei der Zellkontrolle waren ein konfluenter Zellrasen (Teilabbildungen A), intakte Zellkerne (Teilabbildungen B) und keine virusinfizierten Zellen zu erkennen (Teilabbildungen C). Auch ein erhöhter Fettsäureimport in die Zelle konnte nicht nachgewiesen werden (Teilabbildungen D). Auch nach 24 h p. i. spiegelte sich der protektive Effekt von Orlistat in Form von weniger infizierten Zellen wider. Orlistat hatte jedoch keinen Einfluss auf die Fettsäureaufnahme aus dem Extrazellularraum (Abb. 6.24).



**Abbildung 6.23: Darstellung der Fettsäureaufnahme aus dem Extrazellularraum in CVB3-EGFP infizierte Zellen 10 h p.i.** 1 h vor Infektion wurden die Zellen mit 170  $\mu$ M Orlistat bzw. DMSO behandelt. Die Infektion erfolgte mit CVB3-EGFP (MOI 10). Vor der Fixierung der Präparate erfolgte die Färbung mit Bodipy. Vergrößerung: 400x **A:** Lichtmikroskop **B:** Fluoreszenzmikroskop, Hoechst 33342-Färbung **C:** Fluoreszenzmikroskop, EGFP-Nachweis **D:** Fluoreszenzmikroskop, Bodipy-Färbung.



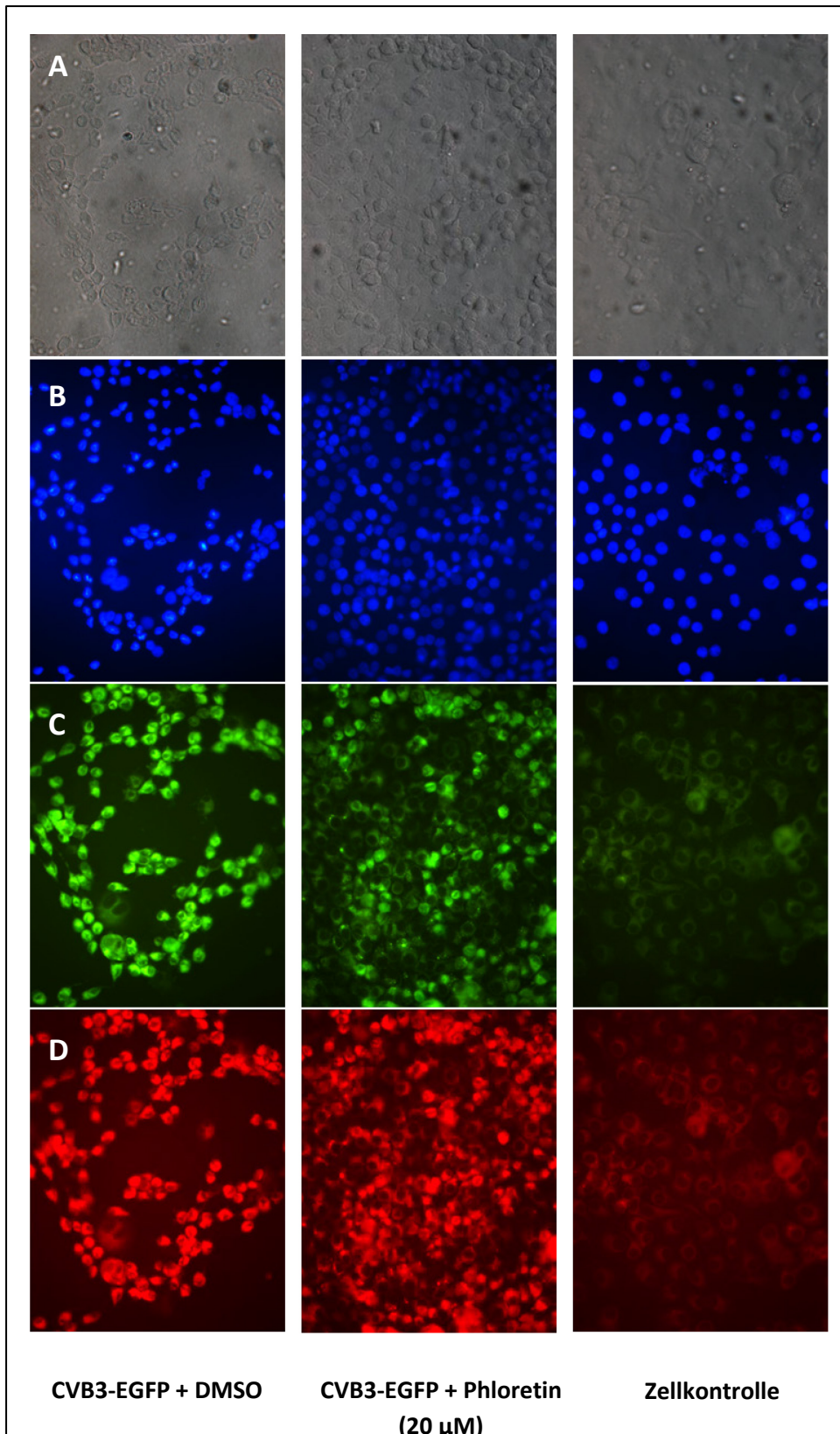


**Abbildung 6.24:** Darstellung der Fettsäureaufnahme aus dem Extrazellularraum in CVB3-EGFP infizierte Zellen 24 h nach Infektion. 1 h vor Infektion wurden die Zellen mit 170  $\mu$ M Orlistat bzw. DMSO behandelt. Die Infektion erfolgte mit CVB3-EGFP (MOI 10). Vor der Fixierung der Präparate erfolgte die Färbung mit Bodipy. Vergrößerung: 400x **A:** Lichtmikroskop **B:** Fluoreszenzmikroskop, Hoechst 33342-Färbung **C:** Fluoreszenzmikroskop, EGFP-Nachweis **D:** Fluoreszenzmikroskop, Bodipy-Färbung.

### **6.5.2 Nachweis der Fettsäureaufnahme mittels Bodipy nach Phloretin-Applikation**

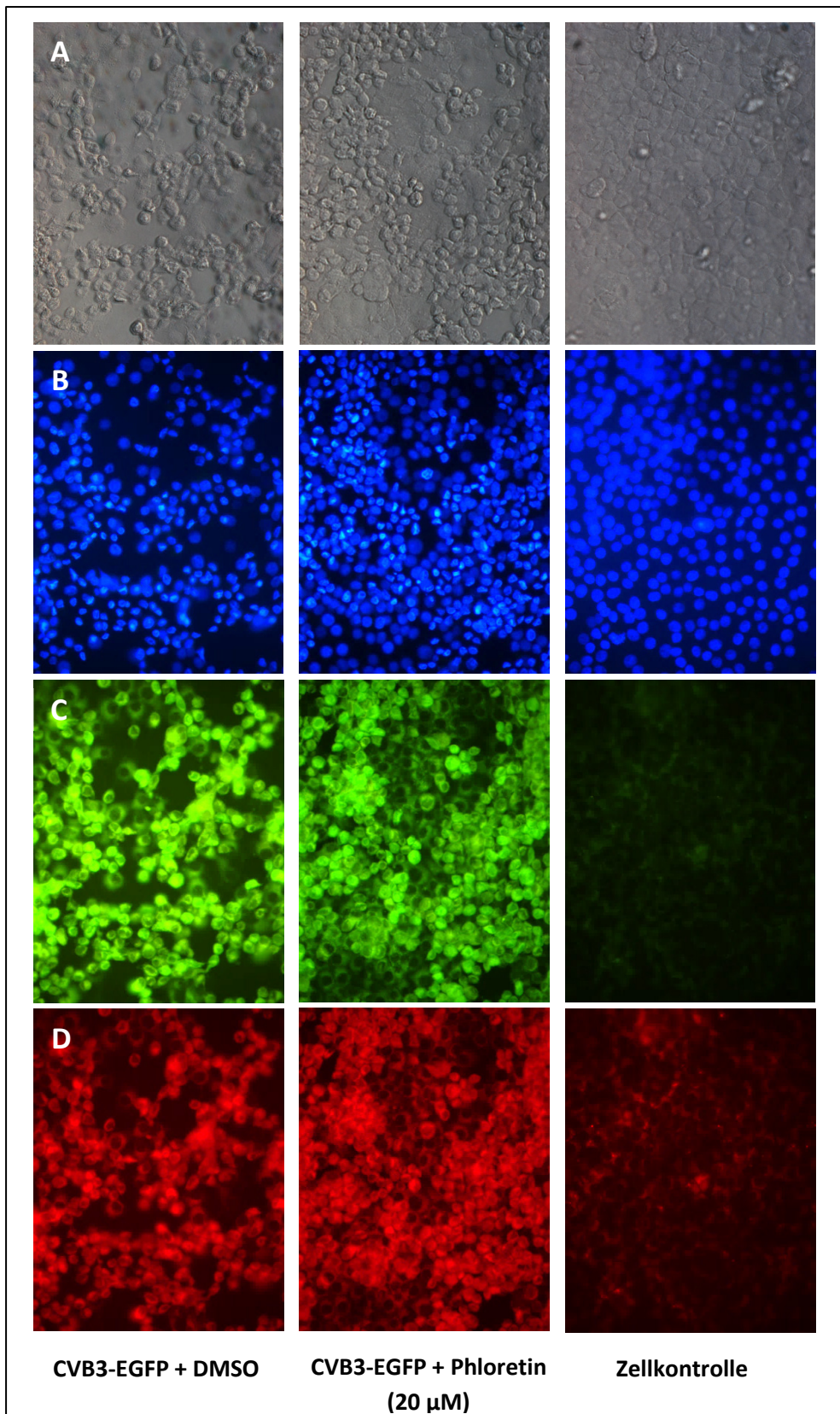
Auch für Phloretin galt es zu untersuchen, in wieweit die Substanz die Aufnahme von Fettsäuren aus dem Extrazellarraum beeinflusste. Die folgende Abbildung (Abb. 6.25) verdeutlicht die Wirkung von Phloretin auf CVB3EGFP-infizierte GMK-Zellen.

Dabei zeigte sich in der lichtmikroskopischen Untersuchung bei den mit Phloretin vorbehandelten Präparaten eine in Teilen erhaltene Konfluenz des Zellrasens. Bei den DMSO-Präparaten war die Auflösung des Zellrasens weiter fortgeschritten, bei der Zellkontrolle voll erhalten (Teilabbildungen A). Teilabbildungen B illustrierten die Fragmentierung der Zellkerne. Dabei ist die Morphologie bei den DMSO-Präparaten bei einer größeren Zellzahl verändert, als bei den Phloretin-Präparaten. In der Zellkontrolle fanden sich ausschließlich intakte Kerne. Aus Teilabbildung C lässt sich entnehmen, dass nach Phloretin-Vorbehandlung weniger Zellen das grün fluoreszierende EGFP-Protein enthielten, als nach DMSO-Vorbehandlung. Bei der Zellkontrolle konnte kein EGFP nachgewiesen werden. Mittels Bodipy-Färbung (Teilabbildung D) ließ sich die Fettsäureaufnahme in infizierte Zellen beurteilen. Dabei zeigte sich, dass nach Phloretin weniger Fettsäuren aufgenommen wurden (schwächer fluoreszierende Zellen) als nach DMSO-Vorbehandlung. In der Zellkontrolle ließ sich ein geringer Transport von Fettsäuren aus dem Extrazellarraum in das Zytoplasma von Zellen feststellen. Im Vergleich mit Abbildung 6.26 wurde außerdem deutlich, dass nach 24 h kein Unterschied mehr zwischen DMSO- und Phloretin-Proben bestand. Zudem war die Zahl der virusinfizierten Zellen angestiegen.



**Abbildung 6.25: Mit Phloretin (20 µM) oder DMSO vorbehandelte und mit CVB3-EGFP infizierte GMK-Zellen 10 h p. i.** 1 h vor Infektion mit CVB3-EGFP (MOI 10) wurden die Zellkulturen mit Phloretin oder DMSO versetzt, die Zellkontrolle blieb unbehandelt und nicht infiziert. Vor der Fixierung wurden die Präparate mit Bodipy angefärbt. Vergrößerung: 400x **A:** Lichtmikroskop **B:** Fluoreszenzmikroskop, Hoechst 33342-Färbung **C:** Fluoreszenzmikroskop, EGFP-Nachweis **D:** Fluoreszenzmikroskop, Bodipy-Färbung



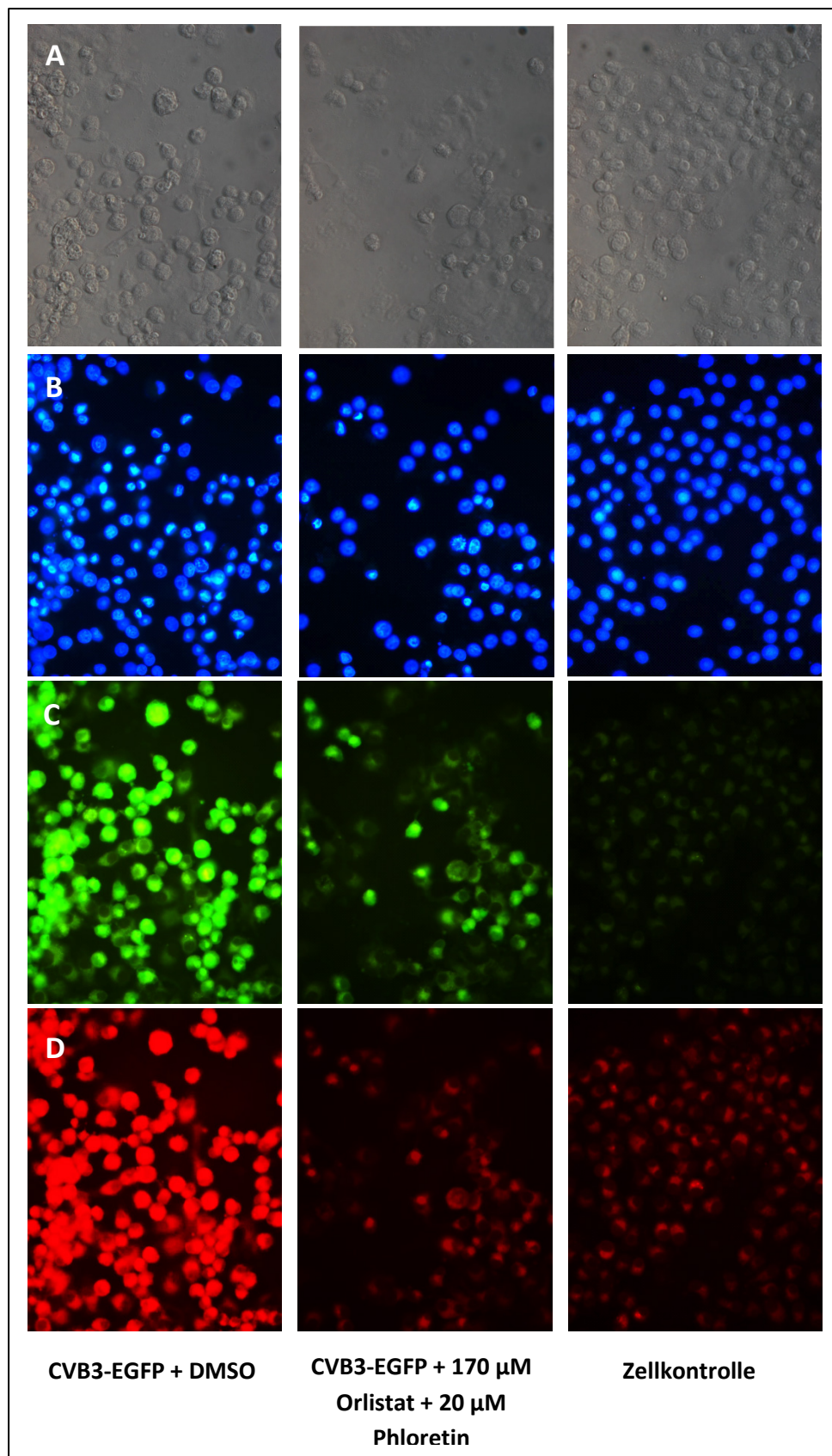


**Abbildung 6.26: Mit Phloretin (20 µM) bzw. DMSO vorbehandelte und mit CVB3-EGFP infizierte GMK-Zellen 24 h p. i.** 1 h vor Infektion mit CVB3-EGFP (MOI 10) wurden die Zellkulturen mit Phloretin oder DMSO versetzt, die Zellkontrolle blieb unbehandelt und nicht infiziert. Vor der Fixierung wurden die Präparate mit Bodipy angefärbt. Vergrößerung: 400x **A:** Lichtmikroskop **B:** Fluoreszenzmikroskop, Hoechst 33342-Färbung **C:** Fluoreszenzmikroskop, EGFP-Nachweis **D:** Fluoreszenzmikroskop, Bodipy-Färbung.

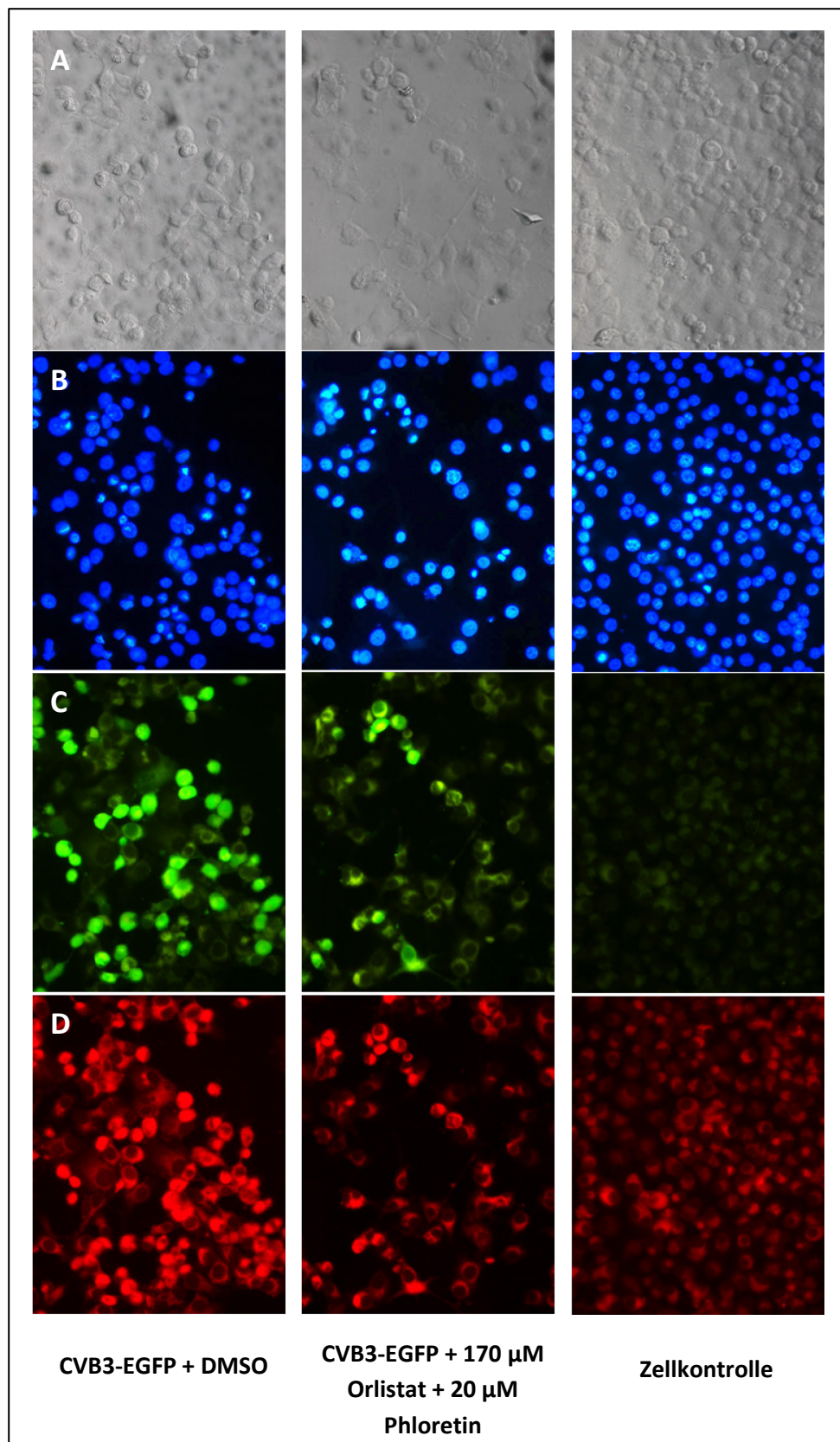


### **6.5.3 Nachweis der Fettsäureaufnahme mittels Bodipy nach Orlistat- und Phloretin-Applikation**

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung mit Bodipy hinsichtlich der Fettsäureaufnahme nach Orlistat- und Phloretin-Applikation zeigen Abbildung 6.27 und 6.28. 10 h p. i. war nach Vorbehandlung mit 170  $\mu$ M Orlistat und 20  $\mu$ M Phloretin die Kontinuität des Zellrasens weniger unterbrochen und es imponierten weniger abgerundete Zellen, als nach Vorbehandlung mit DMSO (Abb. 6.27). Bei der Zellkontrolle zeigten sich keine Veränderungen im Zellrasen (Teilabbildungen A). Aus den Teilabbildungen B wird ersichtlich, dass die Zahl an kondensierten Zellkernen nach Orlistat- und Phloretin-Vorbehandlung geringer war, als nach DMSO Behandlung. Bei der Zellkontrolle zeigten sich durchweg intakte Zellkerne. Aus dem Nachweis von grün-fluoreszierendem EGFP in infizierten Zellen ging hervor, dass die Anzahl der infizierten Zellen nach Applikation beider Substanzen geringer ausfiel als nach DMSO-Gabe. In der Zellkontrolle fielen keine fluoreszierenden Zellen auf (Teilabbildungen C). Wie in den Teilabbildungen D dargestellt, hatte die Vorbehandlung Einfluss auf die Aufnahme von Fettsäuren aus dem Extrazellularraum: es wurden deutlich weniger Fettsäuren importiert, als nach Vorbehandlung mit DMSO. In der Zellkontrolle konnte eine geringe Fettsäureaufnahme nachgewiesen werden. Im Vergleich zu Abbildung 6.27 fiel bei Abbildung 6.28 auf, dass die Virusreplikation durch Orlistat und Phloretin zwar gehemmt, der inhibierende Effekt auf die Fettsäureaufnahme aber nicht mehr nachweisbar war.



**Abbildung 6.27: Mit Orlistat und Phloretin oder DMSO vorbehandelte und mit CVB3-EGFP infizierte GMK-Zellen 10 h nach Infektion.** 1 h vor Infektion wurden die Zellkulturen mit 170 µM Orlistat und 20 µM Phloretin bzw. DMSO versetzt, die Zellkontrolle blieb unbehandelt und nicht infiziert. Die Infektion erfolgte mit CVB3-EGFP (MOI 10). Vor der Fixierung wurden die Präparate mit Bodipy angefärbt. Vergrößerung: 400x; **A:** Lichtmikroskop **B:** Fluoreszenzmikroskop, Hoechst 33342-Färbung **C:** Fluoreszenzmikroskop, EGFP-Nachweis **D:** Fluoreszenzmikroskop, Bodipy-Färbung.



**Abbildung 6.28: Mit Orlistat und Phloretin oder DMSO vorbehandelte und mit CVB3-EGFP infizierte GMK-Zellen 24 h nach Infektion.** 1 h vor Infektion wurden die Zellkulturen mit 170 µM Orlistat und 20 µM Phloretin bzw. DMSO versetzt, die Zellkontrolle blieb unbehandelt und nicht infiziert. Die Infektion erfolgte mit CVB3-EGFP (MOI 10). Vor der Fixierung wurden die Präparate mit Bodipy angefärbt. Vergrößerung: 400 x **A:** Lichtmikroskop **B:** Fluoreszenzmikroskop, Hoechst 33342-Färbung **C:** Fluoreszenzmikroskop, EGFP-Nachweis **D:** Fluoreszenzmikroskop, Bodipy-Färbung.

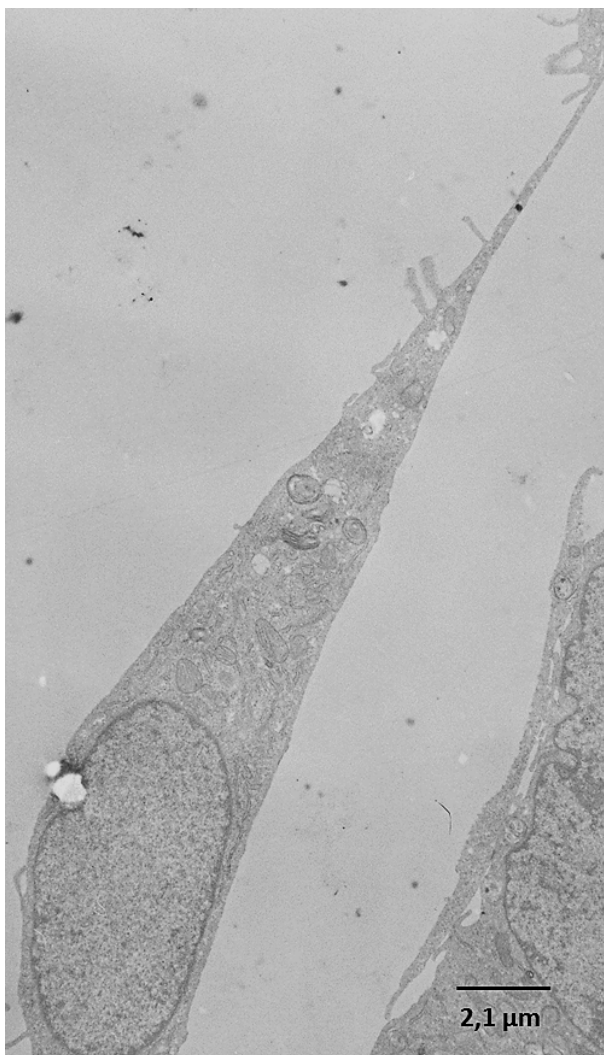


## 6.6 Elektronenmikroskopische Aufnahmen

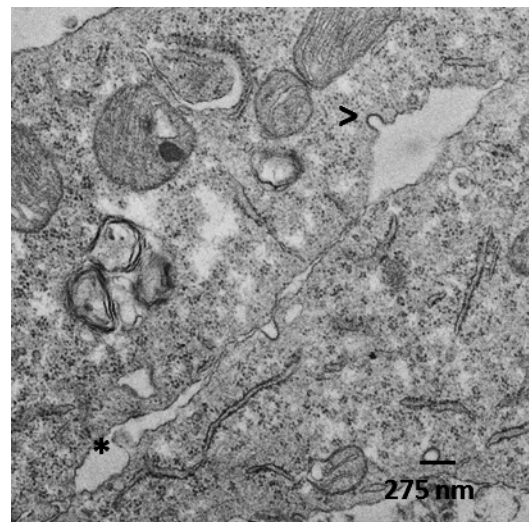
Um den Einfluss auf die Viroplasmenbildung zu illustrieren, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen erstellt. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf Veränderungen der Zellmorphologie und des Zytoplasmas, Ausbildung von Viroplasmen und Vorhandensein von Coxsackieviren gelegt. Verwendet wurden Vergrößerungen zwischen 3300 und 200000x.

### 6.6.1 Elektronenmikroskopische Darstellung nicht infizierter GMK-Zellen

Abbildung 6.29 zeigt eine nicht infizierte Zelle. Sie haftete am Untergrund, zeigte eine spindelförmige Gestalt, intakte Zellorganellen, homogenes Zytoplasma und einen runden Zellkern. Die weißen Perforationen sind Fixationsartefakte. Abbildung 6.30 illustriert die Zell-Zell-Kommunikation durch Vesikel. Die obere Zelle war in der Endozytose begriffen, die untere in der Exozytose eines Vesikels.



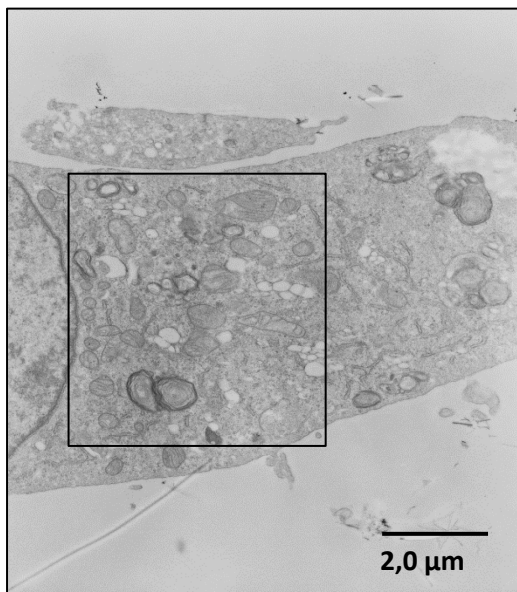
**Abb. 6.29: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer GMK-Zelle.** Nach 72 h Inkubationszeit wurde der Zellrasen fixiert und elektronenmikroskopisch untersucht. Das Zytoplasma ist homogen, reichlich Zellorganellen sind erkennbar, der Kern ist gleichmäßig begrenzt und rund.



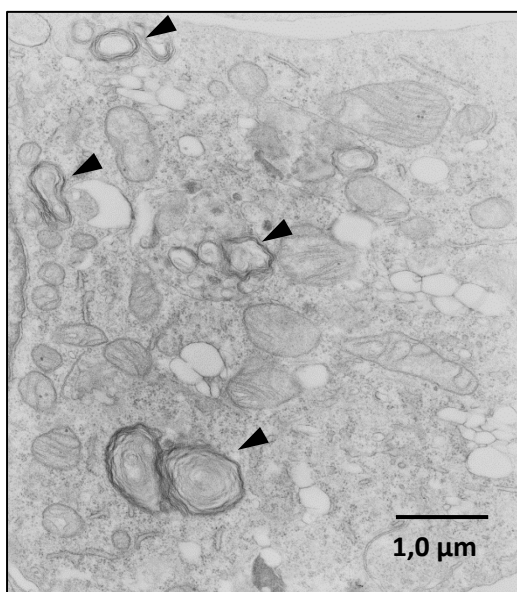
**Abbildung 6.30: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Zytoplasmas zweier GMK-Zellen.** Nach 72 h Inkubationszeit wurde der Zellrasen fixiert und elektronenmikroskopisch untersucht. Eine exozytotische Ausstülpung (\*) der Zellmembran und eine endozytotische Veränderung (>) sind markiert.

### 6.6.2 Elektronenmikroskopische Darstellung virusinfizierter GMK-Zellen

GMK-Zellen wurden mit DMSO behandelt und mit CVB3 (MOI 10) infiziert. Vergleichend wurde eine unbehandelte und nicht infizierte Zellkontrolle mitgeführt. In Abbildung 6.31 wurden erste Veränderungen durch die Virusinfektion (MOI 10) deutlich: 4 h nach Infektion begann die Zelle sich abzurunden. Im Zytoplasma zeigten sich erste Vakuolen. Beide Veränderungen sind Zeichen der Apoptose. Zellorganellen und Zellkern erschienen hingegen intakt. In einer höheren Vergrößerung fielen mehrere lamellare Membranstrukturen auf (Abb. 6.32, Ausschnitt aus Abb. 6.31). Es handelte sich dabei vermutlich um Viroplasmen, die von Coxsackieviren zur erfolgreichen Replikation benötigt werden.

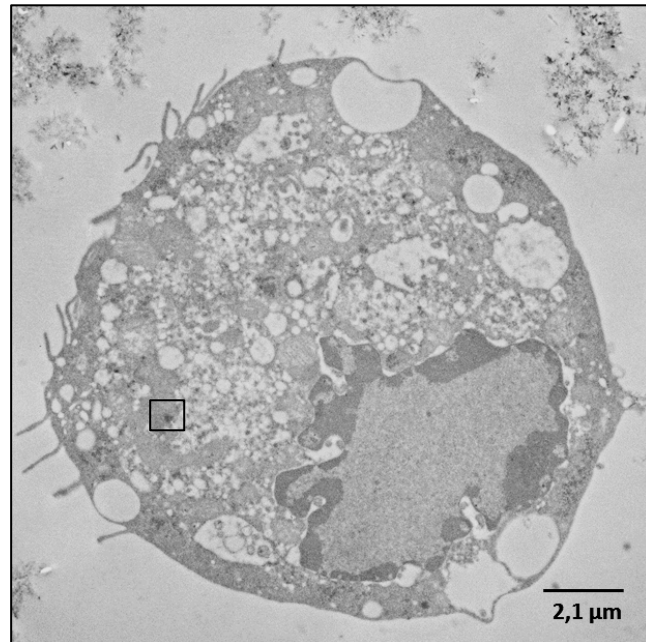


**Abb. 6.31: CVB3-infizierte GMK Zelle 4 h p. i.** Die Zellen wurden nach 68 h Inkubationszeit mit DMSO behandelt, infiziert (MOI 10), 4 h p. i. fixiert und elektronenmikroskopisch untersucht. Die Zellen begannen sich abzurunden, im Zytoplasma zeigten sich erste Vakuolen, Zellkern und Zellorganellen erschienen intakt. Die Markierung zeigt den in Abb. 2.32 vergrößerten Ausschnitt.



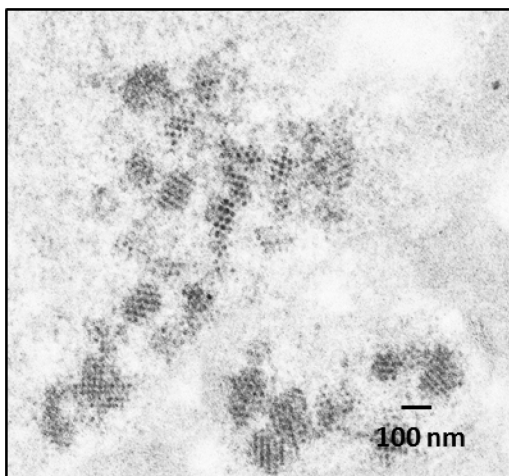
**Abb. 6.32: CVB3-infizierte GMK Zelle 4 h p. i.** Die Zellen wurden mit DMSO behandelt, nach 68 h Inkubationszeit infiziert (MOI 10), 4 h p. i. fixiert und elektronenmikroskopisch untersucht. Es zeigten sich mehrere lamellare Membranstrukturen im Zytoplasma (Pfeilspitzen).

Nach 10 Stunden waren die durch die Infektion hervorgerufenen Veränderungen weiter fortgeschritten: Die Zelle hatte sich vollständig abgerundet und aus dem Zellverband gelöst. Das Zytoplasma erschien durch zahlreiche Vakuolen und Einschmelzungen inhomogen, der Kern begann zu kondensieren und es waren keine Zellorganellen erkennbar (Abb. 6.33).



**Abbildung 6.33: CVB3-infizierte GMK Zelle 10 h p. i.** Die Zellen wurden mit DMSO behandelt, nach 62 h Inkubationszeit infiziert (MOI 10), 10 h p. i. fixiert und elektronenmikroskopisch untersucht. Die Zelle erschien abgerundet, das Zytoplasma inhomogen, der Zellkern war entrundet, Zellorganellen nicht erkennbar. Die Markierung hebt den vergrößerten Ausschnitt von Abb. 6.34 hervor.

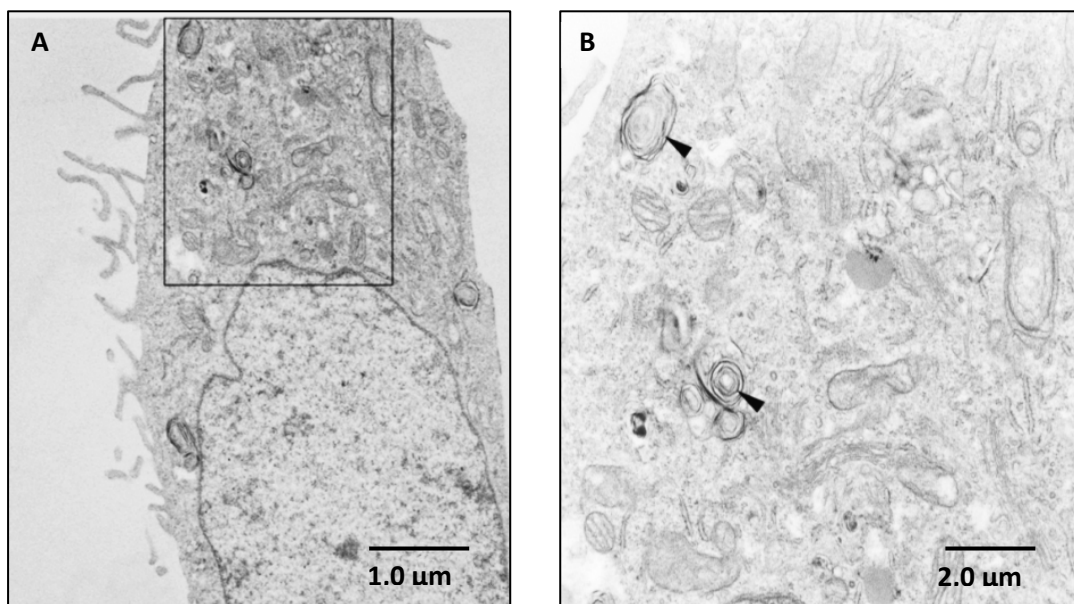
Durch höhere Vergrößerungen konnten freie Cocksackieviren im Intrazellularraum dargestellt werden (Abb. 6.34). Sie imponierten als in parallelen Reihen angeordnete, einheitlich große Partikel.



**Abb. 6.34: Elektronenmikroskopische Darstellung von Cocksackieviren 10 h p. i.**

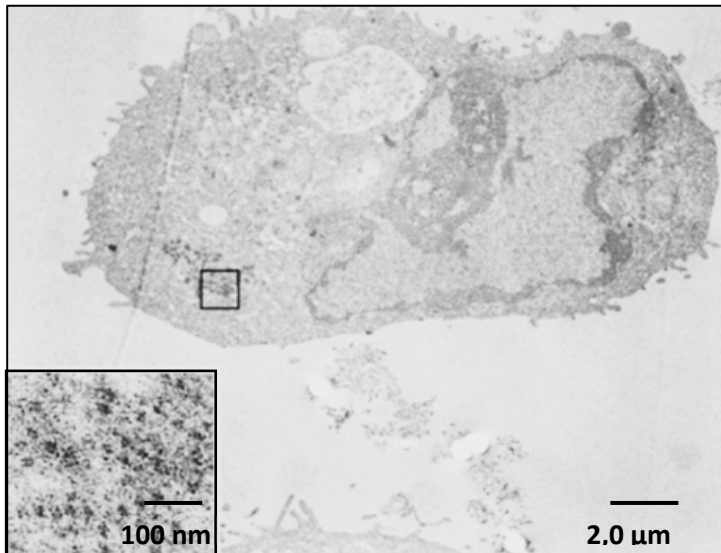
### 6.6.3 Elektronenmikroskopische Darstellung orlistat-behandelter und CVB3-infizierter GMK-Zellen

Wurde der Zellrasen vor der Infektion mit 170  $\mu\text{M}$  Orlistat behandelt, waren die zytopathologischen Effekte bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung 4 h p. i. weniger ausgeprägt, als in den Kontrollen (Abb. 6.35). Die Zelle war noch nicht abgerundet und der Kontakt zu den Nachbarzellen blieb bestehen. Die Morphologie des Zellkerns und der Zellorganellen zeigten keine Unregelmäßigkeiten. Auffällig war, dass sich eine geringere Anzahl an membranösen Strukturen (Viroplasmen) im Zytoplasma fand als bei DMSO-behandelten Zellen (vgl. Abb. 6.31 und 6.32).



**Abb. 6.35: Mit 170  $\mu\text{M}$  Orlistat behandelte und mit CVB3-infizierte GMK Zelle 4 h p. i.** Nach 67 h Inkubationszeit wurde die Zellen mit Orlistat behandelt, danach infiziert (MOI 10), 4 h p. i. fixiert und elektronenmikroskopisch untersucht. Es zeigten sich mehrere membranöse Strukturen im Zytoplasma (Pfeilspitzen).

10 Stunden nach der Infektion mit CVB3 (MOI 10) war die Wirkung von Orlistat nicht mehr erkennbar. Die Zellen waren abgerundet und vom Untergrund gelöst, das Zytoplasma erschien nicht länger homogen, sondern mit einer Vielzahl an Vakuolen durchsetzt. Ferner konnten Viren nachgewiesen werden (Abb. 6.36).

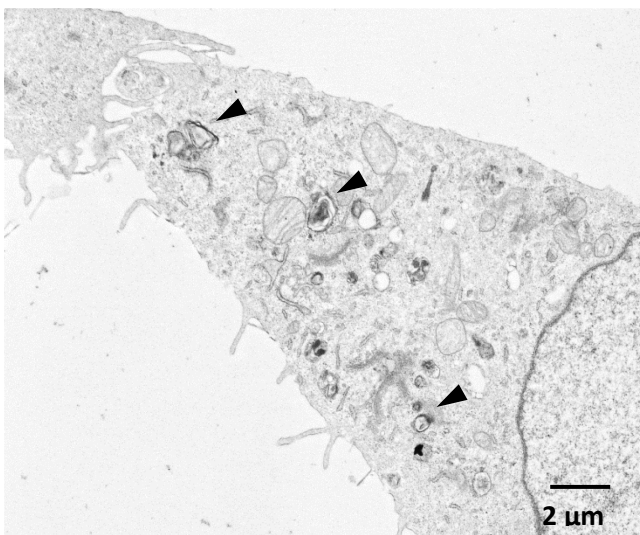


**Abb. 6.36:** Mit 170 µM Orlistat behandelte und mit CVB3 infizierte GMK-Zellen 10 h p. i. Die Zellen wurden nach 61 h Inkubationszeit mit Orlistat behandelt, danach mit CVB3 infiziert und 10 h p. i. fixiert sowie elektronenmikroskopisch untersucht. Es zeigten sich Coxsackieviren im Zytoplasma. Die Markierung hebt den vergrößerten Ausschnitt hervor.

#### 6.6.4 Elektronenmikroskopische

##### Darstellung phloretin-behandelter und CVB3-infizierter GMK-Zellen

Im Unterschied zur Orlistat-Behandlung zeigte sich nach Phloretin-Behandlung (20 µM) kein Effekt auf die Viroplasmenbildung. Nach 4 h waren die Zellen noch nicht in der Abrundung begriffen, auch der Kontakt zu den Nachbarzellen bestand noch. Im Zytoplasma zeigten sich jedoch erste Vakuolen. Es konnten ähnlich viele Viroplasmen wie nach DMSO-Behandlung nachgewiesen werden (Abb. 6.37).

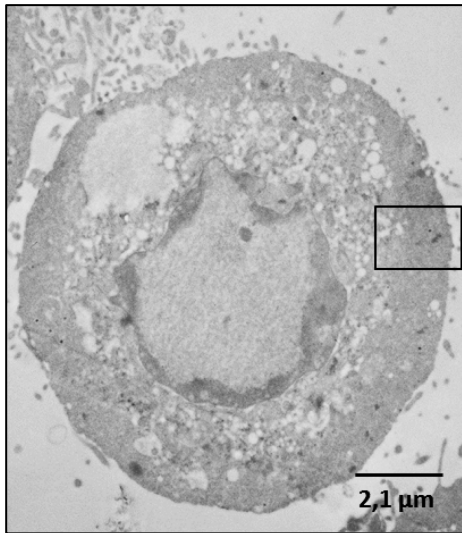


**Abb. 6.37:** Mit 20 µM Phloretin behandelte und mit CVB3 infizierte GMK-Zellen 4 h p. i. Die Zellen wurden nach 67 h Inkubationszeit mit Orlistat behandelt, danach mit CVB3 infiziert und 4 h p. i. fixiert sowie elektronenmikroskopisch untersucht. Zellorganellen und Zellkern waren intakt. Es zeigten sich mehrere Viroplasmen (Pfeilspitzen) im Zytoplasma.

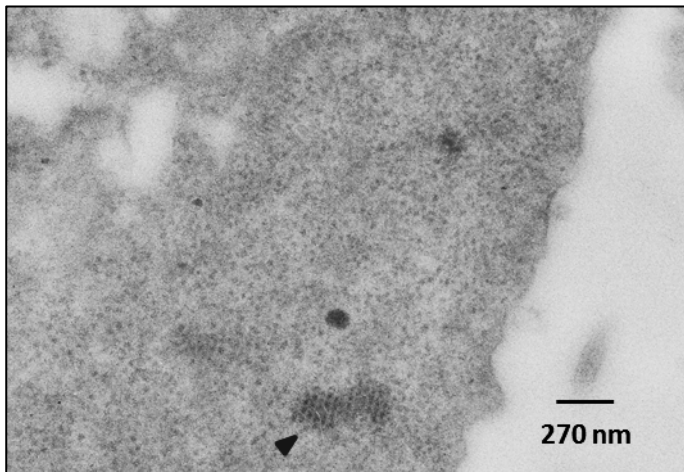
Aus einer zweiten Aufnahme 10 h p. i. ging hervor, dass die Zellen sich gänzlich abgerundet und vom Untergrund gelöst hatten. Es konnten keine intakten Zellorganellen nachgewiesen werden, während der Zellkern zu kondensieren begann. Im Zytoplasma fielen Vakuolen und



Virensammlungen auf (Abb. 6.38). Abbildung 6.39 hebt in einer höheren Vergrößerung die zahlreichen Coxsackieviren hervor.



**Abb. 6.38: Mit 20 µM Phloretin behandelte und mit CVB3 infizierte GMK-Zellen 10 h p. i.** Die Zellen wurden nach 61 h Inkubationszeit mit Orlistat behandelt, danach mit CVB3 infiziert und 10 h p. i. fixiert sowie elektronenmikroskopisch untersucht. Die Zellen waren abgerundet, das Zytoplasma mit Vakuolen durchsetzt und keine intakten Zellorganellen erkennbar. Es zeigten sich mehrere Ansammlungen von Viren im Zytoplasma. Die Markierung hebt den in Abb. 6.39 vergrößerten Abschnitt hervor.



**Abb. 6.39: Ausschnitt aus Abb. 6.38.** Coxsackieviren in einer mit 20 µM Phloretin vorbehandelten GMK-Zelle 10 h p. i.

In der elektronenmikroskopischen Betrachtung glichen die mit Phloretin vorbehandelten Zellen den Kontrollen, während die Gabe von Orlistat in bis zu 10 h nach Infektion einen protektiven Effekt auf GMK-Zellen hatte. Neben vitalerer Zellmorphologie und -Kern war auch die Zahl der Viroplasmen geringer. Dabei ist zu beachten, dass die elektronenmikroskopischen Bilder lediglich der Veranschaulichung dienen und keine objektive Aussagekraft besitzen.

## 7 Diskussion

Vor dem Hintergrund hoher Raten an coxsackievirus-induzierten Myokarditiden und den schwerwiegenden Folgen einer solchen Infektion kommt dem Erkenntnisgewinn über Virusverbreitung und Vermehrung sowie der Untersuchung neuer Therapieansätze große Bedeutung zu. Neben niedermolekularen Substanzen, die das Capsid stabilisieren und so das Uncoating verhindern sollen, Rezeptorblockern, die die Adhäsion an die Wirtszelle unterbinden und Nitritoxid-Donatoren, die die viralen Proteasen 2a und 3C hemmen, sind auch Nukleosidanaloga (z. B. Ribavirin) Gegenstand der wissenschaftlichen Forschung (Heim *et al.* 1997, Kishimoto *et al.* 1988, Saura *et al.* 1999, Smith *et al.* 1986, Yanagawa *et al.* 2003). Ferner gilt der immunmodulierenden Funktion von Interferonen, sowie die Wirkung von antisense Oligonukleotiden zur Verhinderung der viralen Translation und small interfering RNA Molekülen, welche virale Gene unterdrücken, großes Interesse (Grimm und Kay 2007, Kurreck 2003, Zhou *et al.* 2009).

Ein weiterer Ansatzpunkt zur Therapie der coxsackievirus-induzierten Myokarditis stellen Eingriffe in den Metabolismus der Wirtszellen dar. Hier konnte besonders für den Fettsäurestoffwechsel ein deutlicher Einfluss auf die Replikation von Coxsackieviren festgestellt werden (Wilsky *et al.* 2011). Orlistat hemmt die zelleigene Fettsäuresynthase, was eine reduzierte Fettsäurebereitstellung nach sich zieht. Dies hat Auswirkungen auf die Viroplasmenbildung. Und, da diese für die virale Vermehrung essentiell sind, somit auch auf die Replikationsrate von Coxsackieviren. Für Hepatitis C Viren und auch CVB3 konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Fettsäuresynthase von infizierten Zellen vermehrt exprimiert wird (Rassmann *et al.* 2007, Yang *et al.* 2008). Wenn durch die Virusinfektion die Exprimierung der Fettsäuresynthase gefördert wird, hätte im Umkehrschluss eine Hemmung große Auswirkung auf die Virusreplikation. Die Fettsäuresynthase könnte somit einen wichtigen Angriffspunkt in der antiviralen Therapie darstellen.

Um die Wirkungsweise von Orlistat analysieren zu können, wurde die Substanz zunächst 1 h vor Infektion hinzugegeben. Auf diese Weise war gewährleistet, dass die zelluläre Fettsäureproduktion bereits zu Infektionsbeginn gehemmt war. Es war also zu keiner Zeit eine Virusreplikation bei intakter Fettsäuresynthase möglich, wie es bei Orlistat-Zugabe zu einem späteren Zugabezeitpunkt der Fall gewesen wäre. Auch andere Arbeitsgruppen gaben im Rahmen der Tumorforschung Orlistat 2 h bis 20 Minuten vor der Auswertung hinzu, um

den Effekt auf die Fettsäuresynthese nachweisen zu können (Knowles *et al.* 2004, Kridel *et al.* 2004). In der fluoreszenzmikroskopischen Analyse zeigten sich nach Orlistat-Applikation deutlich weniger infizierte Zellen als in den Kontrollen (vgl. Abb. 6.10). Die Inhibition der Fettsäuresynthese mittels Orlistat reduziert also die Replikation von CVB3-EGFP. Ähnliches hatten Rassmann *et al.* (2007) bereits für Cerulenin und Wilsky *et al.* (2011) für Amentoflavone nachgewiesen. Aufgrund der rein deskriptiven Aussage der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen lässt dies aber keinen Schluss zu, wie deutlich die Hemmung der Replikation im Vergleich zu unbehandelten Zellen ausfiel. Um die Ergebnisse zu quantifizieren, wäre eine Erweiterung des Experiments um fluormetrische Messungen möglich (Seok *et al.* 2007). In den hier durchgeführten Versuchen mit CVB3-EGFP sollte hingegen lediglich ein erster Eindruck hinsichtlich der Wirksamkeit von Orlistat gewonnen werden. Die Folge der Fettsäuresynthese-Hemmung, die sich in einer verminderten Viroplasmenbildung äußert, konnte zudem durch elektronenmikroskopische Aufnahmen deutlich gemacht werden (vgl. Abb. 6.35). Auch weitere morphologische Veränderungen infizierter Zellen (verbreiterte Mitochondrien, kondensierter Zellkern, Durchsetzung des Zytoplasmas mit Vakuolen), die unterschiedliche Arbeitsgruppen beobachtet hatten, waren nach Orlistat-Gabe aufgrund der verminderten Replikationsrate deutlich geringer ausgeprägt (Paloheimo *et al.* 2011, Rabin *et al.* 1964). Orlistat scheint also zum Erhalt der Funktion von Zellorganellen und physiologischer Zellfunktionen virusinfizierter Zellen beizutragen. Möglicherweise hat Orlistat auch Einfluss auf die Ausbildung von virusbeladenen Mikrovesikeln, die als „Virusfähren“ benachbarte Zellen auch ohne Lyse der Ursprungszelle infizieren können (Paloheimo *et al.* 2011, Robinson *et al.* 2014). Bei reduzierter Fettsäuresynthese ist auch von einer verminderten Vesikelbildung auszugehen und damit von einer geringeren Rate an auf diesem Weg neu infizierten Zellen. In weiteren Versuchen ließe sich dieser Gesichtspunkt mittels „fluorescent timer CVB3-EGFP“ untersuchen, da auf diese Weise anhand von Farbänderungen der infizierten Zellen die Ausbreitung von CVB3 verfolgt werden kann (Robinson *et al.* 2014). Möglicherweise könnte so eine verlangsamte oder weniger weit reichende Ausbreitung der Infektion nach Orlistat-Gabe beobachtet werden. Es ist davon auszugehen, dass die verminderte Replikationsrate und die verminderte Vesikelbildung die geringere Infektionsrate unter Orlistat-Einfluss erklären.

Die Quantifizierung der gewonnenen Erkenntnisse durch TCID<sub>50</sub>-Tests zum Hergang der Replikationshemmung mittels Orlistat bestätigte eine Reduktion des Virustiters. Dabei fiel jedoch auf, dass diese nach 10 h nicht mehr so deutlich ausgeprägt war. Es ist denkbar, dass nach dieser Zeit die Zellvitalität bereits etwas herabgesetzt war (Sigma-Aldrich 2015a). Dies würde durch die verminderte Zellintegrität die Freisetzung von Viren erleichtern (Bozym *et al.* 2011, Tracy *et al.* 2008). Um diese These zu stützen, hätte jedoch ein steilerer Anstieg des extrazellulären Titters im Vergleich zum intrazellulären Anstieg zu verzeichnen sein müssen. Da dies nicht der Fall war, kann nicht von einer vermehrten Freisetzung ausgegangen werden. Die Inkubationszeit der Zellen vor der Behandlung mit Orlistat betrug 24 h. Es ist also anzunehmen, dass sie sich noch in der Wachstumsphase befanden und so keine Einschränkungen hinsichtlich der Zellvitalität zu erwarten waren. Dies bedeutet, dass zum Zeitpunkt der Infektion der Stoffwechsel der Zellen maximal aktiviert war, um Wachstum und Teilung zu gewährleisten. Folglich war auch der Bedarf an Fettsäuren erhöht Currie *et al.* (2013). Besonders die *de novo* Synthese spielt hier bei der Bereitstellung von Fettsäuren eine entscheidende Rolle (Scaglia *et al.* 2014). Orlistat hat *in vivo* eine Halbwertszeit von 1-2 Stunden (Pubchem Open Chemistry Database 2015). Mohammadi *et al.* (2006) stellten *in vitro* einen Rückgang der Aktivität um 60% binnen 30 Minuten fest. Zwar hemmt Orlistat die Fettsäuresynthese irreversibel, kann aber womöglich die fortlaufend in hoher Zahl exprimierte Fettsäuresynthese aufgrund der raschen Inaktivierung nicht mehr vollständig abdecken (Dowling *et al.* 2009). Dabei zeigte sich eine Konzentrationsabhängigkeit: Je höher die verwendete Orlistat-Konzentration, desto suffizienter konnte die Fettsäuresynthese gehemmt werden (vgl. Abb. 6.9). Während die Zellzahl zunimmt, geht die Wirkung von Orlistat zurück. Hinzu kommt, dass Zellen neben der Synthese von Fettsäuren auch deren Import aus dem Extrazellularraum zur Verfügung steht, auf den sie zur Akquirierung von Fettsäuren ausweichen können. Nach 10 h war es den Zellen möglicherweise gelungen, die fehlende *de novo* Synthese weitestgehend zu ersetzen. Dies hätte zur Folge, dass nach 10 h Orlistat weitestgehend wirkungslos geworden war (vgl. Abb. 6.2). Ein weiterer Gesichtspunkt ist die Beobachtung von Feuer *et al.* (2002), dass in den aktiven Phasen des Zellzyklus G<sub>1</sub> bzw. S die Virusreplikationsrate am höchsten ist. Dies könnte ein weiterer Grund für die rasche Vermehrung von CVB3 sein, welche durch die nachlassende Wirkung von Orlistat nach 10 h womöglich besonders deutlich ausfällt. Kühnl *et al.* (2014) stellten bei HUVEC-Zellen die höchste Virusfreisetzung zwischen 10 und 24 h fest, Slifka *et al.* (2001) nach 6 Stunden bei

infizierten HeLa-Zellen. Aufgrund divergierender Versuchsaufbauten und Zellkulturen fallen die Ergebnisse unterschiedlich aus. Sie sind aber dennoch richtungsweisend und ein weiterer Anhaltspunkt, der den starken Titeranstieg 10 h p. i. erklären könnte. Interessant wäre unter diesen Gesichtspunkten eine Weiterführung des Versuchs mit einer wiederholten Orlistat-Applikation beispielsweise nach 5 Stunden. Zu untersuchen wäre, ob durch die wiederholte Orlistat-Gabe möglicherweise der inhibitorische Effekt von längerer Dauer wäre. Da Orlistat als Myokarditis-Therapeutikum auf CVB3-infizierte Kardiomyozyten wirken sollte, könnten Experimente an Zellen, die sich in der stationären Phase befinden, einen weiteren interessanten Ansatz darstellen. Hier gälte es zu ermitteln, ob der Einfluss von Orlistat möglicherweise ausgeprägter oder andauernder ist, als bei in der Wachstumsphase befindlichen Zellen. Dies käme der Situation in Kardiomyozyten näher. Auch Untersuchungen zur Wirkungsdauer von Orlistat und dem Infektionsverlauf von CVB3 unter Orlistat-Einfluss in Herzmuskelzellen wären vor diesem Hintergrund von wissenschaftlichem Interesse.

Die Unterschiede in der Titerhöhe im Intrazellularraum verglichen mit dem Extrazellularraum sind zum einen der Versuchsdurchführung und zum anderen dem natürlichen Infektionsverlauf geschuldet. Eine Stunde nachdem die Zellkulturen mit CVB3 infiziert worden waren, wurden der Überstand entfernt und der Zellrasen gespült. Auf diese Weise sollten die extrazellulär befindlichen Viren entfernt werden. Da die Zellen vorsichtig gewaschen werden mussten, um mechanische Schäden zu vermeiden, ist es aber wahrscheinlich, dass auch Viren im Überstand verblieben. Bei der Freisetzung der intrazellulären Viren befanden sich auf diese Weise auch aus dem Extrazellularraum stammende Viren in der Probe. Dies führte möglicherweise zu falsch hohen intrazellulären Titern und könnte den deutlichen Unterschied in der Titerhöhe erklären. Zhang *et al.* (2013) nutzen die gleiche Methode zur Virusfreisetzung und zur Erhebung der Titer und wiesen ebenfalls intrazellulär höhere Titer nach als extrazellulär. Eine weitere Erklärung für die unterschiedlichen Virustiter intrazellulär verglichen mit extrazellulär ist der Replikationszyklus der Viren. Zunächst sind extrazellulär höhere Titer nachweisbar als intrazellulär, da die infektiöse Lösung in den Extrazellularraum gegeben wurde. Die Replikation beginnt ca. 2,5 h p. i. (Sean und Semler 2008) Dies erklärt, warum 2 h p. i. der Virustiter im Extrazellularraum den in der Zelle überstieg. Erst nach 4 h, als die Replikation bereits fortgeschritten war, konnten intrazellulär hohe Titer nachgewiesen werden. Ab diesem Zeitpunkt lag der intrazelluläre Titer über dem extrazellulären, wobei sich eine

zeitliche Verzögerung zeigte: Der 4 h p. i. ermittelte intrazelluläre Titer entsprach in etwa dem 6 h p. i. extrazellulär ermittelten. Dies ist nachvollziehbar, benötigt doch der Infektionszyklus von Enteroviren 6-7 Stunden (Wang *et al.* 2005). Es dauert also einige Zeit, bis neu synthetisierte Viren freigesetzt werden. Orlistat scheint auf den Prozess der Freisetzung keinen Einfluss zu nehmen. Unter Orlistat gleicht das Verhältnis von intrazellulär ermitteltem Titer zu extrazellulärem Titer dem Verhältnis der unbehandelten Kontrollen. Hätte Orlistat einen Einfluss auf die Virusfreisetzung, so hätte sich diese als verminderter extrazellulärer Titer gezeigt.

Da Orlistat als Medikament zur Gewichtsreduktion bereits im Handel ist, war vor diesem Hintergrund zunächst die Prüfung seiner Wirksamkeit als Prophylaxe einer CVB3-Infektion angezeigt. Aus den durchgeführten Versuchen ging hervor, dass Orlistat ein potentes Virostatikum darstellen könnte. Die Versuche mit Orlistat-Zugabe gleichzeitig mit Infektion und eine Stunde nach Infektion untersuchten den therapeutischen Nutzen bei bereits bestehender Infektion. Die Tatsache, dass Orlistat eine bessere Wirksamkeit hatte, wenn es nach der Infektion zugegeben wurde, prädestiniert es zu einem möglichen Therapeutikum der viralen Myokarditis. Es ist denkbar, dass der stärkere Effekt vom späteren Eintritt der Fettsäuresynthese-Hemmung herrührt. Wurden die Zellen bereits vor der Infektion Orlistat ausgesetzt, hatte dieses zwar genug Zeit, um die Fettsäureproduktion zu hemmen, beeinflusste so allerdings auch den Fettstoffwechsel der Zelle. Die Zellen waren so zum Zeitpunkt der Infektion mit CVB3 möglicherweise bereits darin begriffen, die mangelnde Fettsäureproduktion durch vermehrten Import von Fettsäuren aus dem Extrazellularraum zu ersetzen. Dies hätte zur Folge, dass den Viren zum Zeitpunkt der Replikation mehr Fettsäuren zur Produktion von Viroplasmen zur Verfügung standen. Folglich war die Replikation vor allem zu Beginn durch die Wirkung von Orlistat eingeschränkt, jedoch in geringerem Maße, als bei Zugabe nach dem Infektionszeitpunkt. Angesichts der Beobachtung, dass auch bei Orlistat-Gabe nach Infektion der Titer nach 10 h ähnliche Höhen erreichte, wie bei prophylaktischer Gabe, scheinen besonders die ersten Stunden nach Orlistat-Gabe die Titerhöhe zu beeinflussen (vgl. Abb. 6.4-6.7). Dies liegt möglicherweise in der oben beschriebenen abnehmenden Wirksamkeit von Orlistat begründet. Offensichtlich ist der Effekt auf Zellen, die bereits infiziert wurden, größer. Möglicherweise ist dies der Fall, weil hier Orlistat nicht schon an Wirksamkeit verliert, bevor die Zellen überhaupt infiziert wurden. Orlistat beeinträchtigt die Virusreplikation offenbar besonders in der empfindlichen

Anfangsphase, wenn seine Aktivität noch nicht herabgesetzt ist. CVB3 kann sich unter diesen Umständen scheinbar nicht mehr so gut an die plötzlich veränderte zelluläre Stoffwechselsituation anpassen. Auch Versuche mit Vitamin C als Virostatikum ergaben einen Wirkungsverlust nach 8 h (Ge *et al.* 2014). Offensichtlich scheint CVB3 einige Stunden zu benötigen, um sich an die zelluläre Stoffwechselsituation anzupassen. Wird der Stoffwechsel dabei durch Therapeutika negativ beeinflusst, scheint dies große Auswirkungen auf die Replikationsrate zu haben.

Es lässt sich hingegen keine Aussage darüber treffen, ob Orlistat die Replikation von CVB3 verzögert oder verlangsamt. Im Falle einer Verzögerung entstünden also in Ermangelung von Fettsäuren zunächst kaum Viroplasmen. Erst, wenn durch alternative Wege der Fettsäureakquirierung wieder ausreichend Fettsäuren zur Verfügung stehen, würde die Produktion einer Vielzahl von Viroplasmen und damit die Replikation von CVB3 beginnen. Im Falle einer Verlangsamung ist von einer kontinuierlichen Produktion einer kleinen Menge an Viroplasmen auszugehen. Anhand der erhobenen Daten ist denkbar, dass die Replikation bei prophylaktischer Orlistat-Gabe kontinuierlich, aber auch in geringerer Rate abläuft, da sich hier die Stoffwechsellage durch alternative Methoden der Fettsäuregewinnung zum Vorteil der Viren entwickelte. Bei therapeutischer Orlistat-Gabe ist eine verzögerte Replikation anzunehmen, da durch die negative Beeinflussung des Fettstoffwechsels zunächst nur wenige Viroplasmen gebildet werden können, nach 10 h der Titer aber ähnlich hoch wie bei prophylaktischer Gabe ist. Nach Adaptation an die veränderte Stoffwechsellage scheint die Replikationsrate also umso größer zu sein. Diese Vermutung bedarf aber noch weitergehender Untersuchungen.

Deutlich wurde hingegen, dass Orlistat keinen Einfluss auf Aufnahme und Uncoating des Virus hatte. Wäre dies der Fall, wäre der hemmende Effekt nach prophylaktischer Gabe größer gewesen, als bei Zugabe nach Infektion.

Vor dem Hintergrund der durchgeführten Versuche wäre eine Fortführung der Untersuchungen mit weiteren Substanzen, die in den Fettstoffwechsel virusinfizierter Zellen eingreifen, von großem Interesse. Denkbar wäre z. B. Soraphen A, ein Inhibitor der Acetyl-Co A Carboxylase, welche mit Malonyl-Co A ein wichtiges Substrat der *de novo* Fettsäuresynthese bereitstellt (Jump *et al.* 2011). Soraphen A hat somit eine ähnliche Wirkung wie Orlistat und erwies sich auch im Mausversuch als wirksames Mittel zur Gewichtsreduktion (Schreurs *et al.* 2009). Dabei ist der Wirkeintritt von Soraphen sehr

schnell und hemmt bereits in nanomolaren Dosen die Fettsäuresynthese. Es entfaltet seine Wirkung v. a. an Zellen mit stark exprimierter Fettsäuresynthese, angrenzende Zellen werden weniger beeinflusst und durch den Eingriff in ihren Stoffwechsel geschwächt. (Beckers *et al.*). Diese Eigenschaften prädestinieren es als Virostatikum. Sharon-Frieling und Shenk (2014) demonstrierten dies an humanen Cytomegalieviren. Ob der schnellen und starken Wirkung von Soraphen A erscheint es geeignet die Replikation von CVB3 in ähnlicher Weise wie Orlistat zu inhibieren. Vergleichende Versuche mit Orlistat wären so von großem Interesse.

Neben der *de novo* Synthese von Fettsäuren steht Zellen der Import von Fettsäuren aus dem Extrazellularraum zur Verfügung. Beide Mechanismen sind in poliovirus-infizierten Zellen von Bedeutung und spielen vermutlich auch bei anderen Picornaviren eine Rolle (Nchoutmboube *et al.* 2013). Wird die Fettsäuresynthese durch Orlistat gehemmt und sind somit weniger auf diesem Weg generierte Fettsäuren verfügbar, nutzt die Zelle vermehrt den Import von Fettsäuren, um ihren Bedarf zu decken (Sankaranarayanapillai *et al.* 2013). Diese zweite Möglichkeit der Fettsäuregenerierung wurde in der vorliegenden Arbeit mittels Phloretin gehemmt. Hier zeigte sich im fluoreszierenden Bild kein Unterschied zur DMSO-behandelten Kontrolle (vgl. Abb. 6.14). Die Aufnahmen mit Bodipy-Färbung legen jedoch einen Effekt von Phloretin auf den Fettsäureimport nahe. Die Färbung der aus dem Extrazellularraum aufgenommenen Fettsäuren durch Bodipy fiel nach Phloretin-Applikation schwächer aus, als bei den Kontrollen (vgl. Abb. 6.25). Poreba *et al.* (2012) bestätigten die hemmende Wirkung von Phloretin auf die Fettsäureaufnahme. Dass dies auf die Replikation von CVB3-EGFP keinen Einfluss hatte, lässt sich möglicherweise durch die Tatsache erklären, dass Phloretin nicht die Fettsäuresynthese inhibiert. Diese Fettsäurequelle stand also weiterhin zur Verfügung und konnte zur Viroplasmenbildung genutzt werden. Unter diesen Versuchsbedingungen scheint sie also für die virale Replikation eine größere Rolle zu spielen als der Import von Fettsäuren. In der Literatur wird diese Beobachtung von Hamilton (1998) bestätigt, während Lopatschk *et al.* (2010) Import und *de novo* Synthese gleiche Bedeutung beimessen. Hinzu kommt, dass Phloretin zwar die Protein-assoziierte Fettsäureaufnahme hemmt, jedoch keinen Einfluss auf die Diffusion freier Fettsäuren über die Zellmembran hat. So wurde der Fettsäureimport der Zelle nicht vollständig unterbrochen. Auch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen unterstreichen die Kompensation der inhibierten Fettsäureaufnahme aus dem Extrazellularraum durch alternative Methoden der



Fettsäuregewinnung. Die Bildung von Viroplasmen war trotz Phloretin-Gabe uneingeschränkt möglich (vgl. Abb. 6.37). Es ist folglich ein geringerer Effekt auf die Virusreplikation als nach Orlistat-Applikation zu erwarten.

Womöglich wäre der hemmende Effekt von Phloretin bei Verwendung einer höheren Konzentration als den applizierten 20  $\mu\text{M}$  deutlicher ausgefallen. Hier gilt es jedoch abzuwägen, ob bei höheren Konzentrationen die Ergebnisse nicht durch die Beeinträchtigung der Zellintegrität beeinflusst werden. So ist beispielsweise eine erleichterte Virusfreisetzung und damit raschere Ausbreitung der Infektion denkbar. Auch die Ausbildung zellulärer Kompartimente und Organellen (Golgi, ER) wäre möglicherweise behindert. In der Literatur wurden bei Konzentrationen bis einschließlich 100  $\mu\text{M}$  keine negativen Effekte auf Zellen nachgewiesen (Gitzinger *et al.* 2009). Bei Verwendung von 500  $\mu\text{M}$  Phloretin fand zwar keine Lyse der Zellen statt, aber Veränderungen der Zellmembran auf molekularer Ebene wurden ab Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  Phloretin beschrieben (Abumrad *et al.* 1981, Cseh und Benz 1999). Höhere Konzentrationen (über 500  $\mu\text{M}$  Phloretin) führten zum Tod der Zellen (Abumrad *et al.* 1981). Da sich im WST-1 Test zwischen 20  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  kein deutlicher Unterschied hinsichtlich der Zytotoxizität darstellte (vgl. Tab. 6.2), wurde in den eigenen fluoreszenz- und elektronenmikroskopischen Versuchen Phloretin in der Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  verwendet. So sollten potentiell zellschädigende Effekte, die Einfluss auf die Virusvermehrung haben könnten, vermieden werden. In einer Versuchsanordnung mit fluorescent timer CVB3-EGFP wäre die Ausbreitung der Infektion in Echtzeit zu verfolgen (Robinson *et al.* 2014). So könnte untersucht werden, ob höhere Phloretin-Konzentrationen durch ihren destabilisierenden Einfluss auf die Zellmembran möglicherweise die Ausbreitung der Infektion beschleunigen. Da für höhere Konzentrationen aber auch die größte Wirkung auf die Fettsäureaufnahme beschrieben wurde und somit der größte Effekt auf die Replikation von CVB3 zu erwarten ist, wurden bei der Quantifizierung der Ergebnisse mittels TCID<sub>50</sub>-Test Phloretin-Konzentrationen bis 200  $\mu\text{M}$  verwendet (Abumrad *et al.* 1981). Eine konzentrationsabhängige Hemmung der Virusvermehrung ließ sich nicht feststellen, im Gegenteil, nach Behandlung mit 200  $\mu\text{M}$  Phloretin war der Titer extrazellulär so hoch wie bei den Kontrollen (vgl. Abb. 6.13). Dies lässt darauf schließen, dass Phloretin in höheren Konzentrationen die Membranintegrität beeinträchtigt und somit die Virusfreisetzung erleichtert. Für 20  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  ließ sich dies nicht beobachten, allerdings zeigte sich auch kein inhibierender Einfluss auf die Replikation von CVB3. Die

Überlegung, dass die hemmende Wirkung von Phloretin auf den Fettsäureimport durch *de novo* Synthese und Fettsäureaufnahme aus Chylomkironen via Vesikel kompensiert wird, konnte hier bekräftigt werden. Da Phloretin eine Halbwertszeit von 70 h hat, ist die mangelnde Wirkung nicht auf eine rasche Inaktivierung der Substanz zurückzuführen (Gitzinger *et al.* 2009). Die vermehrte Expression der Fettsäuresynthase in sich teilenden und in virusinfizierten Zellen führte bei Orlistat zu dessen raschem Wirkungsverlust. Für Phloretin bedeutet dies, dass in Anbetracht der stark exprimierten Fettsäuresynthase die Hemmung des Fettsäureimports von untergeordneter Rolle für die Zelle ist. Sie schlug sich so nicht in einer verminderten Replikationsrate von CVB3 nieder. Die aktive Aufnahme von Fettsäuren macht im Vergleich zur passiven Diffusion 54 % aus. Phloretin erleichtert möglicherweise durch Veränderung der Membranpermeabilität die freie Diffusion von Fettsäuren über die Zellmembran (Abumrad *et al.* 1998). Dies bedeutet, dass die Phloretin zwar den proteinvermittelten Fettsäureimport hemmt, gleichzeitig aber den Anteil der freien Diffusion an der Fettsäureaufnahme steigert. Damit trüge es durch die unmittelbar verstärkte Diffusion zu einer eigenen Wirkungslosigkeit bei. Eventuell wäre für Phloretin ein Folgeversuch wie für Orlistat mit einer Zugabe nach Infektion interessant. Möglicherweise ist der Effekt ähnlich wie bei Orlistat größer, bzw. erst nachweisbar, wenn die Zelle keine Möglichkeit hatte, die Wirkung von Phloretin zu kompensieren, das Gleichgewicht also noch nicht in Richtung freier Diffusion verschoben ist. Da durch die Infektion aber auf jeden Fall die Fettsäuresynthase vermehrt exprimiert wird, unabhängig davon, ob durch Phloretin das Gleichgewicht der Fettsäuregewinnung zu ihren Gunsten verschoben wurde, sind jedoch allenfalls moderate Effekte zu erwarten.

Die Beobachtungen legen nahe, Orlistat und Phloretin zu kombinieren, um so sowohl Fettsäuresynthese als auch Fettsäureimport zu hemmen. Um den membrandestabilisierenden Effekt von Phloretin zu minimieren und die bestmögliche Wirkung von Orlistat zu nutzen, wurden die Konzentrationen 20  $\mu$ M Phloretin und 170  $\mu$ M Orlistat verwendet. Die Ergebnisse zeigten sowohl in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (vgl. Abb. 6.27) als auch in der Quantifizierung mittels TCID<sub>50</sub>-Test (vgl. Abb. 6.17) eine deutliche Hemmung der CVB3-Replikation, die stärker ausfiel als durch die Einzelsubstanzen. Offensichtlich wird durch die duale Wirkungsweise die Fettsäuregewinnung der Zellen in einem solchen Maß eingeschränkt, dass dies klare Auswirkungen auf die Viroplasmenbildung durch CVB3 hat. Eine Kompensation ist nur noch

durch freie Diffusion möglich. Dieser Vorgang kann zwar nicht gesättigt werden, scheint jedoch weitaus ineffektiver als Import und *de novo* Synthese zu sein. Besonders im Zeitraum 4 h p. i. bis 6 h p. i. zeigte sich der hemmende Effekt. Dieser Zeitraum deckt sich mit der Replikationsdauer von Coxsackieviren (Wang *et al.* 2005). Der Fettsäuremangel macht sich also zum Zeitpunkt des höchsten Bedarfs am stärksten bemerkbar. Es zeigte sich, dass der inhibierende Effekt von Orlistat verlängert werden konnte. Auch nach 10 h lag der Titer nach Orlistat- und Phloretin-Behandlung unter den Werten der DMSO-Kontrolle. Die Kompensation mittels Diffusion bzw. durch Neusynthese von Fettsäuresynthase scheint also deutlich langsamer zu sein, als wenn die über den Import von Fettsäuren über Carrier erfolgte. Blieb der Zelle durch die Hemmung dieses Alternativweges nur noch die Diffusion über die Membran scheint der Adaptationsvorgang auch 10 h p. i. noch nicht abgeschlossen zu sein. Der anhaltende Mangel an Fettsäuren schlug sich in niedrigeren Virustitern nieder. Denkbar ist weiterhin, dass die Kompensation mittels Diffusion nicht nur langsamer, sondern auch ineffizienter ist. Die Zelle kann allein auf diesem Weg nicht ihren Bedarf an Fettsäuren in dem Maß decken, als dass Viroplasmenbildung durch CVB3 möglich wäre. Interessant wäre vor diesem Hintergrund eine Substanzgabe nach Infektion. Dem nachlassenden Effekt von Orlistat durch seine schnelle Inaktivierung bei gleichzeitig vermehrter Expression der Fettsäuresynthase könnte auf diese Weise begegnet werden. Da Phloretin mit 70 h eine sehr lange Halbwertszeit hat, ist hier von keinem, diesem Umstand geschuldeten, Wirkungsverlust auszugehen. Eine erneute Phloretin-Gabe wäre somit nicht notwendig. Interessant wäre die Beobachtung, wann die Zelle ihren Fettsäurebedarf allein durch Diffusion decken kann, oder ob dies aufgrund des erhöhten Bedarfs nicht möglich ist. In diesem Fall könnte die andauernde Wirkung von Orlistat und Phloretin ohne eine suffiziente Kompensationsmöglichkeit zum Zelltod führen (Pike *et al.* 2011). Möglicherweise wäre hierzu die Weiterführung des Versuches über 10 h p. i. hinaus sinnvoll, um die verlängerte Wirkungsdauer und ggf. die erfolgreiche Kompensation zu untersuchen. Auch eine Versuchsreihe mit erneuter Gabe von Orlistat nach 6 h p. i. wäre interessant. Auf diese Weise könnte die, aufgrund der geringen Halbwertszeit, nachlassenden Wirkung von Orlistat unterbunden werden. Eine erneute Gabe von Phloretin, um eventuell neu synthetisierte Carrier zu blockieren, erscheint vor dem Hintergrund der Membrantoxizität kontraproduktiv. Gegebenenfalls könnte Phloretin in geringeren Dosen erneut appliziert werden. Durch diesen Versuchsaufbau ließe sich möglicherweise die Wirkung von Orlistat und Phloretin

noch weiter verlängern und der Effekt auf die Replikationshemmung fiel deutlich bzw. andauernder aus. Dabei gälte es jedoch zu überprüfen, ob die Zellen durch den dann langanhaltenden Mangel an Fettsäuren beeinträchtigt werden und somit der Infektion durch CVB3 Vorschub leisten.

Abschließend lässt sich festhalten, dass sowohl Orlistat als auch Phloretin aufgrund ihrer Pharmakokinetik geeignete Medikamente zur Therapie der viralen Myokarditis wären. Zudem wurden beide Substanzen bereits in anderem Zusammenhang am Menschen getestet. Phloretin verteilt sich, dermal aufgetragen, im ganzen Körper (Auner *et al.* 2003). Für Phloretin wurde eine Reduktion der Fettsäureaufnahme in Kardiomyozyten um 45-50% nachgewiesen (Poreba *et al.* 2012). Zudem konnte eine anti-inflammatorische Komponente beobachtet werden, die in einer Antagonisierung von Prostaglandinen begründet liegt (Blazsó und Gábor 1995). Dies könnte zum antiviralen Effekt bei der Therapie der Myokarditis unterstützend hinzukommen. Da der durch Phloretin inhibierte Transporter CD36 v. a. in Herzmuskelzellen, Skelettmuskelzellen und Zellen des Magen-Darm-Traktes exprimiert wird, fiel die Wirkung von Phloretin hier also am stärksten aus. Orlistat ist zellpermeabel, müsste aber intravenös verabreicht werden, da es aus dem Magen-Darm-Trakt schlecht resorbiert wird (Knowles *et al.* 2004). Es wäre allerdings fraglich, ob bei systemischer Gabe von einer selektiven Wirkung am Herzen ausgegangen werden kann. Da jedoch Herzmuskelzellen bis zu 70% der Energie aus Fettsäuren gewinnen können, ist es denkbar, dass hier bereits niedrige Dosen eine antivirale Wirkung erzielen, während andere Zellen erst auf höhere Gaben reagieren (Lopaschuk *et al.* 2010). Vor diesem Hintergrund erscheinen Kardiomyozyten prädestiniert für eine Therapie, die in den Fettstoffwechsel der Zellen eingreift.

Im Anbetracht der Tatsache, dass Orlistat als Monotherapeutikum vor allem nach Infektionsbeginn wirkungsvoll ist, in seiner Wirkung aber rasch nachlässt und Phloretin alleine keine Wirkung auf die Replikationsrate zeigte, kommt weiteren Untersuchungen der Wirkstoffkombination große Bedeutung zu. Die effiziente Hemmung der Fettsäurebereitstellung in einem, für die Zelle tolerablen, Ausmaß stellt somit einen neuen Ansatzpunkt in der Behandlung der viralen Myokarditis dar.

## 8 Schlussfolgerungen

Die Therapie einer coxsackievirus-induzierten Myokarditis verlangt nach einer Therapie der kardialen Virusvermehrung. Da Kardiomyozyten vor allem Fettsäuren zur Energiegewinnung nutzen, ist ein therapeutischer Ansatz, der auf einem Eingriff in den zellulären Fettsäurestoffwechsel beruht, von besonderem Interesse. Aufgrund dieses Phänomens wäre eine organspezifische Wirkung der Medikamente denkbar. Zudem fielen hier Eingriffe in den zellulären Fettsäuremetabolismus besonders deutlich aus und der Effekt auf die Replikationsrate von CVB3 wäre möglicherweise sehr groß. Vor diesem Hintergrund trug die vorliegende Arbeit zur Aufklärung der Zusammenhänge zwischen zellulärem Fettsäurestoffwechsel und Virusreplikation bei.

Aus den durchgeführten Versuchen ging hervor, dass die Beeinträchtigung der Viroplasmenbildung durch ein reduziertes Fettsäureangebot zu einer verminderten Virusreplikation führte. Dabei spielte die Hemmung der Fettsäuresynthase mittels Orlistat eine größere Rolle als die Hemmung der Fettsäureaufnahme aus dem Extrazellularraum durch Phloretin. Orlistat schränkte auch bei alleiniger Gabe die Virusreplikation ein, bei Phloretin war dies nur in Kombination mit Orlistat der Fall. Bei beiden Stoffen war ein Abfall der Wirkung im Zeitverlauf nachweisbar. Es lag nahe, dass der hemmende Einfluss der Substanzen durch alternative Wege der Fettsäureakquirierung ersetzt werden konnte. Die rasche Kompensation der Phloretin-Wirkung im Gegensatz zur Orlistat-Wirkung lies den Rückschluss zu, dass die Fettsäuresynthase bei der Fettsäurebereitstellung für die Viroplasmenbildung eine größere Rolle spielt als der Fettsäureimport. Zudem wird der Neusyntheseweg in infizierten Zellen vermehrt aktiviert. So kann der durch Phloretin gehemmte Fettsäureimport durch eine vermehrt exprimierte Fettsäuresynthase ausgeglichen bzw. der Wirkungseintritt ganz verhindert werden. Wurde der Fettsäurestoffwechsel mit Orlistat gehemmt, zeigte sich ein Wirkungsrückgang nach 10 h. Auch dies lässt sich durch die zunehmende Expression von Fettsäuresynthase in infizierten Zellen und der eingeschränkten Wirksamkeitsdauer von Orlistat erklären. Hinzu kommt die Kompensation durch Fettsäureaufnahme aus dem Extrazellularraum. Vor dem Hintergrund der vermehrten Fettsäuresynthase-Expression ist die konzentrationsabhängige Wirkung von Orlistat schlüssig. Bei höheren Dosen konnte dem hoch regulierten Syntheseweg besser begegnet werden. Für Phloretin konnte hingegen keine Konzentrationsabhängigkeit nachgewiesen werden.

Vermutlich heben hier zellmembranschädigende und diffusionfördernde Effekte bei höheren Phloretin-Dosen seine Wirkung auf.

Beim Vergleich der prophylaktischen Orlistat-Gabe mit der therapeutischen Applikation ergab sich eine höhere Wirksamkeit, wenn die Substanz nach der Infektion hinzugegeben wurde. Womöglich beruhte dies darauf, dass eine alternative Möglichkeit der Fettsäuregewinnung zum Infektionszeitpunkt nicht notwendig war und die Zelle so bei Orlistat-Gabe erst mit der Kompensation begann. Zudem hatte Orlistat zum Infektionszeitpunkt so noch nicht an Aktivität eingebüßt. Das so verminderte Angebot an Fettsäuren wirke sich negativ auf die Viroplasmenbildung und damit die Vermehrung von CVB3 aus.

Die Kombination beider Substanzen zeigte die beste Wirkung, da hier die Zelle durch die Hemmung sowohl der Fettsäuresynthese als auch der Fettsäureaufnahme am wirkungsvollsten abgeschirmt war. Interessant wäre eine Versuchsweiterführung mit erneuter Substanzapplikation bzw. Substanzgabe in höheren Dosierungen, um möglicherweise eine andauernde Reduktion der Virusreplikation zu erreichen. Womöglich könnte so dem raschen Wirkungsverlust begegnet werden. Dabei könnte aufgrund seiner langen Wirkdauer und potentiell zytotoxischen Wirkung auf eine erneute Phloretin-Gabe verzichtet und lediglich Orlistat erneut appliziert werden. Für beide Komponenten wären zudem jeweils weiterführende Versuche mit ähnlich wirkenden Substanzen sinnvoll.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Hemmung der Replikation von CVB3 durch Eingriffe in den zellulären Fettstoffwechsel einen interessanten neuen Therapieansatz darstellt, welchen es in Zukunft weiter zu untersuchen gilt.

## 9 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Abumrad NA, Perkins RC, Park JH, Park CR. 1981. Mechanism of long chain fatty acid permeation in the isolated adipocyte. *J Biol Chem* 256(17): 9183-91.
- Abumrad N, Harmon C, Ibrahimi A. 1998. Membrane transport of long-chain fatty acids: evidence for a facilitated process. *J Lipid Res* 39(12): 2309-18.
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413(6857): 732-38.
- Ammer E, Nietzsche S, Rien C, Kühnl A, Mader T, Heller R, Sauerbrei A, Henke, A. 2015. The anti-obesity drug orlistat reveals anti-viral activity. *Medical microbiology and immunology* 204(6): 635-45.
- Anagandula M, Richardson SJ, Oberste MS, Sioofy-Khojine AB, Hyoty H, Morgan NG, Korsgren O, Frisk G. 2013. Infection of human islets of langerhans with two strains of coxsackie B virus serotype 1: Assessment of virus replication, degree of cell death and induction of genes involved in the innate immunity pathway. *J Med Virol* 86(8): 1402-11
- Andersen OS, Finkelstein A, Katz I, Cass A. 1976. Effect of phloretin on the permeability of thin lipid membranes. *J Gen Physiol* 67(6): 749-71.
- Andréoletti L, Lévêque N, Boulagnon C, Brasselet C, Fornes P. 2009. Viral causes of human myocarditis. *Archives of Cardiovascular Diseases* 102(6–7): 559-68.
- Ansari AA, Wang YC, Danner DJ, Gravanis MB, Mayne A, Neckelmann N, Sell KW, Herskowitz A. 1991. Abnormal expression of histocompatibility and mitochondrial antigens by cardiac tissue from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Am J Pathol* 139(2): 337-54.
- Arnesjo B, Eden T, Ihse I, Nordenfelt E, Ursing B. 1976. Enterovirus infections in acute pancreatitis - a possible etiological connection. *Scand J Gastroenterol* 11(7): 645-49.
- Auner BG, Valenta C, Hadgraft J. 2003. Influence of phloretin and 6-ketocholestanol on the skin permeation of sodium-fluorescein. *Journal of Controlled Release* 89(2): 321-28.
- Auner BG, O'Neill MA, Valenta C, Hadgraft J. 2005. Interaction of phloretin and 6-ketocholestanol with DPPC-liposomes as phospholipid model membranes. *Int J Pharm* 294(1-2): 149-55.
- Bach JF. 2005. Infections and autoimmune diseases. *J Autoimmun* 25 Suppl: 74-80.
- Badorff C, Lee GH, Lamphear BJ, Martone ME, Campbell KP, Rhoads RE, Knowlton KU. 1999. Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy. *Nat Med* 5(3): 320-26.
- Ballinger A, Peikin SR. 2002. Orlistat: its current status as an anti-obesity drug. *Eur J Pharmacol* 440(2-3): 109-17.
- Beckers A, Organe S, Timmermans L, Scheys K, Peeters A, Brusselmans K, Verhoeven G, Swinnen JV. 2007. Chemical inhibition of acetyl-CoA carboxylase induces growth arrest and cytotoxicity selectively in cancer cells. *Cancer Res* 67(17): 8180-87.
- Blazsó G, Gábor M. 1995. Effects of prostaglandin antagonist phloretin derivatives on mouse ear edema induced with different skin irritants. *Prostaglandins* 50(3): 161-68.

- Böcker W, Denk H, Heitz PU. 2004. Pathologie. München, Jena: Urban&Fischer.
- Bozym RA, Patel K, White C, Cheung KH, Bergelson JM, Morosky SA, Coyne CB. 2011. Calcium signals and calpain-dependent necrosis are essential for release of coxsackievirus B from polarized intestinal epithelial cells. *Mol Biol Cell* 22(17): 3010-21.
- Caforio AL, Grazzini M, Mann JM, Keeling PJ, Bottazzo GF, McKenna WJ, Schiaffino S. 1992. Identification of alpha- and beta-cardiac myosin heavy chain isoforms as major autoantigens in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 85(5): 1734-42.
- Campanella M, de Jong AS, Lanke KW, Melchers WJ, Willems PH, Pinton P, Rizzuto R, van Kuppeveld FJ. 2004. The coxsackievirus 2B protein suppresses apoptotic host cell responses by manipulating intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *J Biol Chem* 279(18): 18440-50.
- Carthy CM, Granville DJ, Watson KA, Anderson DR, Wilson JE, Yang D, Hunt DW, McManus BM. 1998. Caspase activation and specific cleavage of substrates after coxsackievirus B3-induced cytopathic effect in HeLa cells. *J Virol* 72(9): 7669-75.
- Chase AJ, Semler BL. 2012. Viral subversion of host functions for picornavirus translation and RNA replication. *Future Virol* 7(2): 179-91.
- Chau DH, Yuan J, Zhang H, Cheung P, Lim T, Liu Z, Sall A, Yang D. 2007. Coxsackievirus B3 proteases 2A and 3C induce apoptotic cell death through mitochondrial injury and cleavage of eIF4GI but not DAP5/p97/NAT1. *Apoptosis* 12(3): 513-24.
- Chow LH, Beisel KW, McManus BM. 1992. Enteroviral infection of mice with severe combined immunodeficiency. Evidence for direct viral pathogenesis of myocardial injury. *Lab Invest* 66(1): 24-31.
- Clements GB, Galbraith DN, Taylor KW. 1995. Coxsackie B virus infection and onset of childhood diabetes. *Lancet* 346(8969): 221-23.
- Cooper LT, Jr., ElAmm C. 2012. Giant cell myocarditis. Diagnosis and treatment. *Herz* 37(6): 632-36.
- Cseh R, Benz R. 1999. Interaction of phloretin with lipid monolayers: relationship between structural changes and dipole potential change. *Biophys J* 77(3): 1477-88.
- Currie E, Schulze A, Zechner R, Walther Tobias C, Farese Robert V, Jr. 2013. Cellular Fatty Acid Metabolism and Cancer. *Cell Metabolism* 18(2): 153-61.
- Curry S, Fry E, Blakemore W, Abu-Ghazaleh R, Jackson T, King A, Lea S, Newman J, Stuart D. 1997. Dissecting the roles of VP0 cleavage and RNA packaging in picornavirus capsid stabilization: the structure of empty capsids of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 71(12): 9743-52.
- Dettmeyer R, Strehler M, Winkelmann S, Madea B. 2006. Myokarditis. *Rechtsmedizin* 16(3): 138-42.
- Dorner A, Xiong D, Couch K, Yajima T, Knowlton KU. 2004. Alternatively spliced soluble coxsackie-adenovirus receptors inhibit coxsackievirus infection. *J Biol Chem* 279(18): 18497-03.
- Dotzauer A, Kraemer L. 2012. Innate and adaptive immune responses against picornaviruses and their counteractions: An overview. *World J Virol* 1(3): 91-07.



Dowling S, Cox J, Cenedella RJ. 2009. Inhibition of fatty acid synthase by Orlistat accelerates gastric tumor cell apoptosis in culture and increases survival rates in gastric tumor bearing mice in vivo. *Lipids* 44(6): 489-98.

Elliott P. 2000. Cardiomyopathy. Diagnosis and management of dilated cardiomyopathy. *Heart* 84(1): 106-12.

European medicines Agency. zitiert am: 19. 04. 2016.

[http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000154/human\\_med\\_001158.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000154/human_med_001158.jsp&mid=WC0b01ac058001d124).

Feldman AM, McNamara D. 2000. Myocarditis. *N Engl J Med* 343(19): 1388-98.

Feuer R, Mena I, Pagarigan RR, Harkins S, Hassett DE, Whitton JL. 2003. Coxsackievirus B3 and the neonatal CNS: the roles of stem cells, developing neurons, and apoptosis in infection, viral dissemination, and disease. *Am J Pathol* 163(4): 1379-93.

Florea NR, Maglio D, Nicolau DP. 2003. Pleconaril, a novel antipicornaviral agent. *Pharmacotherapy* 23(3): 339-48.

Ford Siltz LA, Viktorova EG, Zhang B, Kouivskaia D, Dragunsky E, Chumakov K, Isaacs L, Belov GA. 2014. New Small Molecule Inhibitors Effectively Blocking Picornavirus Replication. *J Virol*. 88(19):11091-07.

Freimuth P, Philipson L, Carson SD. 2008. The coxsackievirus and adenovirus receptor. *Curr Top Microbiol Immunol* 323: 67-87.

Ge M, Wang H, Zhang G, Yu S, Li Y. 2014. The antiviral effect of jiadifenoic acids C against coxsackievirus B3. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 4(4): 277-83.

Gitzinger M, Kemmer C, El-Baba MD, Weber W, Fussenegger M. 2009. Controlling transgene expression in subcutaneous implants using a skin lotion containing the apple metabolite phloretin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(26): 10638-43.

Grimm D, Kay MA. 2007. RNAi and gene therapy: a mutual attraction. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 473-81.

Grunweller A, Wyszko E, Bieber B, Jahnel R, Erdmann VA, Kurreck J. 2003. Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2'-O-methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA. *Nucleic Acids Res* 31(12): 3185-93.

Guan J, Sun X, Liang Y, Dong W, Zhang L, Zhu J, Wang G. 2010. Atorvastatin attenuates Coxsackie virus B3m-induced viral myocarditis in mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 56(5): 540-47.

Guertl B, Noehammer C, Hoefler G. 2000. Metabolic cardiomyopathies. *Int J Exp Pathol* 81(6): 349-72.

Gupta S, Markham DW, Drazner MH, Mammen PP. 2008. Fulminant myocarditis. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 5(11): 693-06.

Hadfield AT, Diana GD, Rossmann MG. 1999. Analysis of three structurally related antiviral compounds in complex with human rhinovirus 16. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(26): 14730-35.

Hafenstein S, Bowman VD, Chipman PR, Bator Kelly CM, Lin F, Medof ME, Rossmann MG. 2007. Interaction of decay-accelerating factor with coxsackievirus B3. *J Virol* 81(23): 12927-35.

- Halim S, Ramsingh AI. 2000. A point mutation in VP1 of coxsackievirus B4 alters antigenicity. *Virology* 269(1): 86-94.
- Hamilton JA. 1998. Fatty acid transport: difficult or easy? *J Lipid Res* 39(3): 467-81.
- He YQ, Chen L, Xu WB, Yang H, Wang HZ, Zong WP, Xian HX, Chen HL, Yao XJ, Hu ZL, Luo M, Zhang HL, Ma HW, Cheng JQ, Feng QJ, Zhao DJ. 2013. Emergence, circulation, and spatiotemporal phylogenetic analysis of coxsackievirus a6- and coxsackievirus a10-associated hand, foot, and mouth disease infections from 2008 to 2012 in Shenzhen, China. *J Clin Microbiol* 51(11): 3560-66.
- Heim A, Stille-Seigener M, Pring-Akerblom P, Grumbach I, Brehm C, Kreuzer H, Figulla HR. 1996. Recombinant Interferons beta and gamma have a higher antiviral activity than interferon-alpha in coxsackievirus B3-infected carrier state cultures of human myocardial fibroblasts. *J Interferon Cytokine Res* 16(4): 283-87.
- Heim A, Grumbach I, Pring-Akerblom P, Stille-Siegener M, Muller G, Kandolf R, Figulla HR. 1997. Inhibition of coxsackievirus B3 carrier state infection of cultured human myocardial fibroblasts by ribavirin and human natural interferon-alpha. *Antiviral Res* 34(3): 101-11.
- Hellen CUT, Sarnow P. 2001. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev* 15(13): 1593-12.
- Henke A, Launhardt H, Klement K, Stelzner A, Zell R, Munder T. 2000. Apoptosis in coxsackievirus B3-caused diseases: interaction between the capsid protein VP2 and the proapoptotic protein siva. *J Virol* 74(9): 4284-90.
- Hsiung GD, Wang JR. 2000. Enterovirus infections with special reference to enterovirus 71. *J Microbiol Immunol Infect* 33(1): 1-8.
- Hsu NY, Ilnytska O, Belov G, Santiana M, Chen YH, Takvorian PM, Pau C, van der Schaar H, Kaushik-Basu N, Balla T, Cameron CE, Ehrenfeld E, van Kuppeveld FJ, Altan-Bonnet N. 2010. Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication. *Cell* 141(5): 799-11.
- Huang WT, Lee PI, Chang LY, Kao CL, Huang LM, Lu CY, Chen JM, Lee CY. 2010. Epidemic pleurodynia caused by coxsackievirus B3 at a medical center in northern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 43(6): 515-18.
- Inal JM, Jorfi S. 2013. Coxsackievirus B transmission and possible new roles for extracellular vesicles. *Biochem Soc Trans* 41(1): 299-02.
- Jacobson MF, Asso J, Baltimore D. 1970. Further evidence on the formation of poliovirus proteins. *J Mol Biol* 49(3): 657-69.
- Jaidane H, Hober D. 2008. Role of coxsackievirus B4 in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Diabetes Metab* 34(6 Pt 1): 537-48.
- Jang SK, Krausslich HG, Nicklin MJ, Duke GM, Palmenberg AC, Wimmer E. 1988. A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol* 62(8): 2636-43.
- Jang SK, Pestova TV, Hellen CU, Witherell GW, Wimmer E. 1990. Cap- independent translation of picornavirus RNAs. *Enzyme* 44(1-4):292-09.

Jin O, Sole MJ, Butany JW, Chia WK, McLaughlin PR, Liu P, Liew CC. 1990. Detection of enterovirus RNA in myocardial biopsies from patients with myocarditis and cardiomyopathy using gene amplification by polymerase chain reaction. *Circulation* 82(1): 8-16.

Jump DB, Torres-Gonzalez M, Olson LK. 2011. Soraphen A, an inhibitor of acetyl CoA carboxylase activity, interferes with fatty acid elongation. *Biochem Pharmacol* 81(5): 649-60.

Kawai C. 1999. From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future. *Circulation* 99(8): 1091-100.

Kawai T, Akira S. 2007. Antiviral signaling through pattern recognition receptors. *J Biochem* 141(2): 137-45.

Kayser FH, Böttger EC, Zinkernagel RM, Haller O, Eckert J, Deplazes P. 2001. *Medizinische Mikrobiologie*. Stuttgart, New York: Georg Thieme.

Kim KS, Hufnagel G, Chapman NM, Tracy S. 2001. The group B coxsackieviruses and myocarditis. *Rev Med Virol* 11(6): 355-68.

Kishimoto C, Crumpacker CS, Abelman WH. 1988. Ribavirin treatment of murine coxsackievirus B3 myocarditis with analyses of lymphocyte subsets. *J Am Coll Cardiol* 12(5): 1334-41.

Kleinert S, Weintraub RG, Wilkinson JL, Chow CW. 1997. Myocarditis in children with dilated cardiomyopathy: incidence and outcome after dual therapy immunosuppression. *J Heart Lung Transplant* 16(12): 1248-54.

Klingel K, Hohenadl C, Canu A, Albrecht M, Seemann M, Mall G, Kandolf R. 1992. Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(1): 314-18.

Knowles LM, Axelrod F, Browne CD, Smith JW. 2004. A fatty acid synthase blockade induces tumor cell-cycle arrest by down-regulating Skp2. *J Biol Chem* 279(29): 30540-45.

Knowlton KU. 2008. CVB infection and mechanisms of viral cardiomyopathy. *Curr Top Microbiol Immunol* 323: 315-35.

Konen O, Rathaus V, Bauer S, Dolfen T, Shapiro M. 2000. Progressive liver calcifications in neonatal coxsackievirus infection. *Pediatr Radiol* 30(5): 343-45.

Kridel SJ, Axelrod F, Rozenkrantz N, Smith JW. 2004. Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. *Cancer Res* 64(6): 2070-75.

Kühnl A, Rien C, Spengler K, Kryeziu N, Sauerbrei A, Heller R, Henke A. 2014. Characterization of coxsackievirus B3 replication in human umbilical vein endothelial cells. *Med Microbiol Immunol* 203(4): 217-29.

Kurreck J. 2003. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem* 270(8): 1628-44.

Lapidos KA, Kakkar R, McNally EM. 2004. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res* 94(8): 1023-31.

Lazarus AS, Johnston EA, Galbraith JE. 1952. An outbreak of epidemic pleurodynia, with special reference to the laboratory diagnosis of Coxsackie virus infections. *Am J Public Health Nations Health* 42(1): 20-26.

- Li H, Black PN, Chokshi A, Sandoval-Alvarez A, Vatsyayan R, Sealls W, DiRusso CC. 2008. High-throughput screening for fatty acid uptake inhibitors in humanized yeast identifies atypical antipsychotic drugs that cause dyslipidemias. *J Lipid Res* 49(1): 230-44.
- Li M, Wang X, Yu Y, Xie Y, Zou Y, Ge J, Peng T, Chen R. 2014. Coxsackievirus B3-induced calpain activation facilitates the progeny virus replication via a likely mechanism related with both autophagy enhancement and apoptosis inhibition in the early phase of infection: an in vitro study in H9c2 cells. *Virus Res* 179: 177-86.
- Lim DH, Kim J, Lee JH, Chung ES, Chung TY. 2014. A case of corneal endothelial dysfunction due to coxsackievirus A24 corneal endotheliitis after cataract surgery. *Cornea* 33(5): 533-35.
- Lind K, Svedin E, Utorova R, Stone VM, Flodstrom-Tullberg M. 2014. Type III interferons are expressed by Coxsackievirus-infected human primary hepatocytes and regulate hepatocyte permissiveness to infection. *Clin Exp Immunol* 177(3): 687-95.
- Liu JY, Wang SM, Chen IC, Yu CK, Liu CC. 2013a. Hepatic damage caused by coxsackievirus B3 is dependent on age-related tissue tropisms associated with the coxsackievirus-adenovirus receptor. *Pathog Dis* 68(2): 52-60.
- Liu Q, Huang X, Ku Z, Wang T, Liu F, Cai Y, Li D, Leng Q, Huang Z. 2013b. Characterization of enterovirus 71 capsids using subunit protein-specific polyclonal antibodies. *J Virol Methods* 187(1): 127-31.
- Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CD, Jaswal JS, Stanley WC. 2010. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev* 90(1): 207-58.
- Luk A, Ahn E, Soor GS, Butany J. 2009. Dilated cardiomyopathy: a review. *J Clin Pathol* 62(3): 219-25.
- Luppi P, Licata A, Haluszczak C, Rudert WA, Trucco G, McGowan FX, Jr., Finegold D, Boyle GJ, Trucco M. 2001. Analysis of TCR Vbeta repertoire and cytokine gene expression in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Autoimmun* 16(1): 3-13.
- Machado, Fs, Tanowitz HB, Ribeiro. 2013. Pathogenesis of chagas cardiomyopathy: role of inflammation and oxidative stress. *J Am Heart Assoc* 2(5): e000539
- Maisch B, Schonian U, Crombach M, Wendl I, Bethge C, Herzum M, Klein HH. 1993. Cytomegalovirus associated inflammatory heart muscle disease. *Scand J Infect Dis Suppl* 88: 135-48.
- Mangin M, Mahrholdt H, Sechtem U. 2006. [Diagnosis of myocarditis: description and assessment of available methods]. *Dtsch Med Wochenschr* 131(21): 1228-34.
- Marques F, Brito MJ, Conde M, Pinto M, Moreira A. 2014. Autism spectrum disorder secondary to enterovirus encephalitis. *J Child Neurol* 29(5): 708-14.
- Marsh M, Helenius A. 2006. Virus Entry: Open Sesame. *Cell* 124(4): 729-40.
- Mascaro-Blanco A, Alvarez K, Yu X, Lindenfeld J, Olansky L, Lyons T, Duvall D, Heuser JS, Gosmanova A, Rubenstein CJ, Cooper LT, Kem DC, Cunningham MW. 2008. Consequences of unlocking the cardiac myosin molecule in human myocarditis and cardiomyopathies. *Autoimmunity* 41(6): 442-53.

- McKelvie RS, Yusuf S, Pericak D, Avezum A, Burns RJ, Probstfield J, Tsuyuki RT, White M, Rouleau J, Latini R, Maggioni A, Young J, Pogue J. 1999. Comparison of candesartan, enalapril, and their combination in congestive heart failure: randomized evaluation of strategies for left ventricular dysfunction (RESOLVD) pilot study. The RESOLVD Pilot Study Investigators. *Circulation* 100(10): 1056-64.
- Menegus MA, Hollick GE. 1982. Increased Efficiency of Group B Coxsackievirus Isolation from Clinical Specimens by Use of BGM Cells. *J Clin Microbiol* 15(5): 945-48.
- Menendez JA, Vellon L, Lupu R. 2005. Antitumoral actions of the anti-obesity drug orlistat (Xenical<sup>TM</sup>) in breast cancer cells: blockade of cell cycle progression, promotion of apoptotic cell death and PEA3-mediated transcriptional repression of Her2/neu (erbB-2) oncogene. *Ann Oncol* 16(8): 1253-67.
- Miyamoto T, Matsumori A, Hwang MW, Nishio R, Ito H, Sasayama S. 2001. Therapeutic effects of FTY720, a new immunosuppressive agent, in a murine model of acute viral myocarditis. *J Am Coll Cardiol* 37(6): 1713-18.
- Modlin JF, Bowman M. 1987. Perinatal transmission of coxsackievirus B3 in mice. *J Infect Dis* 156(1): 21-25.
- Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H. 2010. *Molekulare Virologie*. Heidelberg: Springer Spektrum.
- Mohammadi A, Haririan I, Rezanour N, Ghiasi L, Walker RB. 2006. A stability-indicating high performance liquid chromatographic assay for the determination of orlistat in capsules. *J Chromatogr A* 1116(1-2): 153-57.
- Molecular Probes. zitiert am: 20. 05. 2015.  
<https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp03792.pdf>.
- Muckelbauer JK, Kremer M, Minor I, Diana G, Dutko FJ, Groarke J, Pevear DC, Rossmann MG. 1995. The structure of coxsackievirus B3 at 3.5 Å resolution. *Structure* 3(7): 653-67.
- Muehlenbachs A, Bhatnagar J, Zaki SR. 2014. Tissue tropism, pathology and pathogenesis of enterovirus infection. *J Pathol.* 235(2):217-28.
- Müller-Esterl W, Brandt U, Anderka O, Kieß S, Ridinger K, Plenikowski M. 2009. *Biochemie-Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*. Heidelberg: Springer Spektrum.
- Nchoutmboube JA, Viktorova EG, Scott AJ, Ford LA, Pei Z, Watkins PA, Ernst RK, Belov GA. 2013. Increased long chain acyl-CoA synthetase activity and fatty acid import is linked to membrane synthesis for development of picornavirus replication organelles. *PLoS Pathog* 9(6): e1003401.
- Nelson JA, Falk RE. 1993. The efficacy of phloridzin and phloretin on tumor cell growth. *Anticancer Res* 13(6a): 2287-92.
- Netherton CL, Wileman T. 2011. Virus factories, double membrane vesicles and viroplasm generated in animal cells. *Curr Opin Virol* 1(5): 381-87.
- Ni X, Sun JP, Yang XS, Yu CM. 2014. Acute eosinophilic myocarditis. *Int J Cardiol.* 176(3): 1192-94.
- Nieva, JL, Agirre, A, Nir, S, Carrasco, L. 2003. Mechanisms of membrane permeabilization by picornavirus 2B viroporin. *FEBS Lett* 552(1): 68-73.

- Packer M, Bristow MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM, Shusterman NH. 1996. The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group. *N Engl J Med* 334(21): 1349-55.
- Paloheimo O, Ihalainen TO, Tauriainen S, Valilehto O, Kirjavainen S, Niskanen EA, Laakkonen JP, Hyoty H, Vihinen-Ranta M. 2011. Coxsackievirus B3-induced cellular protrusions: structural characteristics and functional competence. *J Virol* 85(13): 6714-24.
- Pankuweit S, Hufnagel G, Eckhardt H, Herrmann H, Uttecht S, Maisch B. 1998. [Cardiotropic DNA viruses and bacteria in the pathogenesis of dilated cardiomyopathy with or without inflammation]. *Med Klin (Munich)* 93(4): 223-28.
- Pankuweit S, Portig I, Eckhardt H, Crombach M, Hufnagel G, Maisch B. 2000. Prevalence of viral genome in endomyocardial biopsies from patients with inflammatory heart muscle disease. *Herz* 25(3): 221-26.
- Pankuweit S, Portig I, Maisch B. 2002. Pathophysiology of cardiac inflammation: molecular mechanisms. *Herz* 27(7): 669-76.
- Pankuweit S, Ruppert V, Maisch B. 2004. Inflammation in dilated cardiomyopathy. *Herz* 29(8): 788-93.
- Park SY, Kim EJ, Shin HK, Kwon DY, Kim MS, Surh YJ, Park JH. 2007. Induction of apoptosis in HT-29 colon cancer cells by phloretin. *J Med Food* 10(4): 581-86.
- Paul D, Bartenschlager R. 2013. Architecture and biogenesis of plus-strand RNA virus replication factories. *World J Virol* 2(2): 32-48.
- Penninger JM, Pummerer C, Liu P, Neu N, Bachmaier K. 1997. Cellular and molecular mechanisms of murine autoimmune myocarditis. *Apmis* 105(1): 1-13.
- Pevear DC, Tull TM, Seipel ME, Groarke JM. 1999. Activity of pleconaril against enteroviruses. *Antimicrob Agents Chemother* 43(9): 2109-15.
- Phillips BA, Summers DF, Maizel JV, Jr. 1968. In vitro assembly of poliovirus-related particles. *Virology* 35(2): 216-26.
- Pietra BA, Kantor PF, Bartlett HL, Chin C, Canter CE, Larsen RL, Edens RE, Colan SD, Towbin JA, Lipshultz SE, Kirklin JK, Naftel DC, Hsu DT. 2012. Early predictors of survival to and after heart transplantation in children with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 126(9): 1079-86.
- Pike LS, Smift AL, Croteau NJ, Ferrick DA, Wu M. 2011. Inhibition of fatty acid oxidation by etomoxir impairs NADPH production and increases reactive oxygen species resulting in ATP depletion and cell death in human glioblastoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1807(6): 726-34.
- Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J. 1999. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 341(10): 709-17.
- Poreba MA, Dong CX, Li SK, Stahl A, Miner JH, Brubaker PL. 2012. Role of fatty acid transport protein 4 in oleic acid-induced glucagon-like peptide-1 secretion from murine intestinal L cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303(7): E899-07.
- Prinz JC. 2004. Disease mimicry--a pathogenetic concept for T cell-mediated autoimmune disorders triggered by molecular mimicry? *Autoimmun Rev* 3(1): 10-15.

PubChem open chemistry database. zitiert am: 24. 09. 2015  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/orlistat>.

Quinn GP, Keough MJ. 2002. *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*. Cambridge, New York, Melbourne, Madrid, Cape Town, Singapore, São Paulo: Cambridge University Press.

Rabin ER, Hassan SA, Jenson AB, Melnick JL. 1964. Coxsackie Virus B3 Myocarditis in Mice: An Electron Microscopic, Immunofluorescent and Virus-Assay Study. *Am J Pathol* 44(5): 775-97.

Rassmann A, Henke A, Jarasch N, Lottspeich F, Saluz HP, Munder T. 2007. The human fatty acid synthase: a new therapeutic target for coxsackievirus B3-induced diseases? *Antiviral Res* 76(2): 150-58.

Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. 2006. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia* 20(9): 1487-95.

Reed LJ, Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Epidemiol* 27(3): 493-97.

Reikine S, Nguyen JB, Modis Y. 2014. Pattern Recognition and Signaling Mechanisms of RIG-I and MDA5. *Front Immunol* 5: 342.

Reimann BY, Zell R, Kandolf R. 1991. Mapping of a neutralizing antigenic site of Coxsackievirus B4 by construction of an antigen chimera. *J Virol* 65(7): 3475-80.

Repass GL, Palmer WC, Stancampiano FF. 2014. Hand, foot, and mouth disease: Identifying and managing an acute viral syndrome. *Cleve Clin J Med* 81(9): 537-543.

Riabi S, Harrath R, Gaaloul I, Bouslama L, Nasri D, Aouni M, Pillet S, Pozzetto B. 2014. Study of Coxsackie B viruses interactions with Coxsackie Adenovirus receptor and Decay-Accelerating Factor using Human CaCo-2 cell line. *J Biomed Sci* 21: 50.

Robinson SM, Tsueng G, Sin J, Mangale V, Rahawi S, McIntyre LL, Williams W, Kha N, Cruz C, Hancock BM, Nguyen DP, Sayen MR, Hilton BJ, Doran KS, Segall AM, Wolkowicz R, Cornell CT, Whitton JL, Gottlieb RA, Feuer R. 2014. Coxsackievirus B exits the host cell in shed microvesicles displaying autophagosomal markers. *PLoS Pathog* 10(4): e1004045.

Rose NR. 2008. Autoimmunity in coxsackievirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 323: 293-14.

Rose NR. 2014. Learning from myocarditis: mimicry, chaos and black holes. *F1000Prime Rep* 6: 25.

Rotbart HA. 1995. Enteroviral infections of the central nervous system. *Clin Infect Dis* 20(4): 971-81.

Sagar S, Liu PP, Cooper LT, Jr. 2012. Myocarditis. *Lancet* 379(9817): 738-47.

Saji T, Matsuura H, Hasegawa K, Nishikawa T, Yamamoto E, Ohki H, Yasukochi S, Arakaki Y, Joo K, Nakazawa M. 2012. Comparison of the clinical presentation, treatment, and outcome of fulminant and acute myocarditis in children. *Circ J* 76(5): 1222-28.

- Sankaranarayanapillai M, Zhang N, Baggerly KA, Gelovani JG. 2013. Metabolic shifts induced by fatty acid synthase inhibitor orlistat in non-small cell lung carcinoma cells provide novel pharmacodynamic biomarkers for positron emission tomography and magnetic resonance spectroscopy. *Mol Imaging Biol* 15(2): 136-47.
- Saura M, Zaragoza C, McMillan A, Quick RA, Hohenadl C, Lowenstein JM, Lowenstein CJ. 1999. An antiviral mechanism of nitric oxide: inhibition of a viral protease. *Immunity* 10(1): 21-28.
- Scaglia N, Tyekucheva S, Zadra G, Photopoulos C, Loda M. 2014. De novo fatty acid synthesis at the mitotic exit is required to complete cellular division. *Cell Cycle* 13(5): 859-68.
- Schartl M, Gessler M, Eckardstein von A. 2009. *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen*. München, Jena: Urban&Fischer.
- Schreurs M, van Dijk TH, Gerding A, Havinga R, Reijngoud DJ, Kuipers F. 2009. Soraphen, an inhibitor of the acetyl-CoA carboxylase system, improves peripheral insulin sensitivity in mice fed a high-fat diet. *Diabetes Obes Metab* 11(10): 987-91.
- Schultheiss HP, Kuhl U. 2006. Overview on chronic viral cardiomyopathy/chronic myocarditis. *Ernst Schering Res Found Workshop*(55): 3-18.
- Sean P, Semler BL. 2008. Coxsackievirus B RNA replication: lessons from poliovirus. *Curr Top Microbiol Immunol* 323: 89-21.
- Seder RA, Gazzinelli R, Sher A, Paul WE. 1993. Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(21): 10188-92.
- Seok SH, Baek MW, Lee HY, Kim DJ, Na YR, Noh KJ, Park SH, Lee HK, Lee BH, Ryu DY, Park JH. 2007. Quantitative GFP fluorescence as an indicator of arsenite developmental toxicity in mosaic heat shock protein 70 transgenic zebrafish. *Toxicol Appl Pharmacol* 225(2): 154-61.
- Shaboodien G, Maske C, Wainwright H, Smuts H, Ntsekhe M, Commerford PJ, Badri M, Mayosi BM. 2013. Prevalence of myocarditis and cardiotropic virus infection in Africans with HIV-associated cardiomyopathy, idiopathic dilated cardiomyopathy and heart transplant recipients: a pilot study. *Cardiovasc J Afr* 23: 1-6.
- Sharon-Friling, R, Shenk, T. 2014. Human cytomegalovirus pUL37x1-induced calcium flux activates PKC $\alpha$ , inducing altered cell shape and accumulation of cytoplasmic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(12): E1140-8.
- Shimomura O. 1979. Structure of the chromophore of Aequorea green fluorescent protein. *FEBS Lett* 104(2): 220-22.
- Shingler KL, Yoder JL, Carnegie MS, Ashley RE, Makhov AM, Conway JF, Hafenstein S. 2013. The enterovirus 71 A-particle forms a gateway to allow genome release: a cryoEM study of picornavirus uncoating. *PLoS Pathog* 9(3): e1003240.
- Si X, Gao G, Wong J, Wang Y, Zhang J, Luo H. 2008. Ubiquitination is required for effective replication of coxsackievirus B3. *PLoS One* 3(7): e2585.
- Sigma-Aldrich. zitiert am: 07. 11. 2015. <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/cell-types-culture.html>.
- Sigma-Aldrich. zitiert am: 27. 04. 2015. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/o4139?lang=de&region=DE>.



Slifka MK, Pagarigan R, Mena I, Feuer R, Whitton JL. 2001. Using Recombinant Coxsackievirus B3 To Evaluate the Induction and Protective Efficacy of CD8(+) T Cells during Picornavirus Infection. *J Virol* 75(5): 2377-87.

Smith TJ, Kremer MJ, Luo M, Vriend G, Arnold E, Kamer G, Rossmann MG, McKinlay MA, Diana GD, Otto MJ. 1986. The site of attachment in human rhinovirus 14 for antiviral agents that inhibit uncoating. *Science* 233(4770): 1286-93.

Stock I. 2014. [Hand, foot and mouth disease--more than a harmless "childhood disease"]. *Med Monatsschr Pharm* 37(1): 4-10; quiz 11-12.

Stryer L. 1985. *Biochemie*. Heidelberg: Springer Spektrum.

Suzuki J, Ogawa M, Watanabe R, Morishita R, Hirata Y, Nagai R, Isobe M. 2011. Autoimmune giant cell myocarditis: clinical characteristics, experimental models and future treatments. *Expert Opin Ther Targets* 15(10): 1163-72.

Swiss Institute of Bioinformatics. zitiert am: 25. 08. 2014.  
[http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/33.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/33.html).

Tracy S, Oberste MS, Drescher KM. 2008. *Group B Coxsackieviruses*. Heidelberg: Springer.

Trochu JN, Piriou N, Toquet C, Bressollette C, Valleix F, Le Tourneau T, Gueffet JP. 2012. [Myocarditis]. *Rev Med Interne* 33(10): 567-74.

Tuthill TJ, Groppelli E, Hogle JM, Rowlands DJ. 2010. Picornaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 343: 43-89.

U.S. Food and Drug Administration. zitiert am: 19. 04. 2016.  
<http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm180076.htm>.

Van Kuppeveld FJ, Hoenderop, JG, Smeets, RL, Willems, PH, Dijkman, HB, Galama, JM Melchers, WJ. 2014. Coxsackievirus protein 2B modifies endoplasmic reticulum membrane and plasma membrane permeability and facilitates virus release. *Embo j* 16 (12): 3519-32.

Viktorova EG, Ford-Siltz LA, Nchoutmboube J, Belov GA. 2014. Fluorescent fatty acid analogs as a tool to study development of the picornavirus replication organelles. *J Virol Methods* 200: 15-21.

Wang A, Salazar AM, Yates MV, Mulchandani A, Chen W. 2005. Visualization and Detection of Infectious Coxsackievirus Replication Using a Combined Cell Culture-Molecular Beacon Assay. *Appl Environ Microbiol* 71(12): 8397-01.

Wang JP, Asher DR, Chan M, Kurt-Jones EA, Finberg RW. 2007a. Cutting Edge: Antibody-mediated TLR7-dependent recognition of viral RNA. *J Immunol* 178(6): 3363-67.

Wang SM, Liu CC, Yang YJ, Yang HB, Lin CH, Wang JR. 1998. Fatal coxsackievirus B infection in early infancy characterized by fulminant hepatitis. *J Infect* 37(3): 270-73.

Wang YX, da Cunha V, Vincelette J, White K, Velichko S, Xu Y, Gross C, Fitch RM, Halks-Miller M, Larsen BR, Yajima T, Knowlton KU, Vergona R, Sullivan ME, Croze E. 2007b. Antiviral and myocyte protective effects of murine interferon-beta and -{alpha}2 in coxsackievirus B3-induced myocarditis and epicarditis in Balb/c mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(1): H69-76.

- Wessely R, Klingel K, Santana LF, Dalton N, Hongo M, Jonathan Lederer W, Kandolf R, Knowlton KU. 1998. Transgenic expression of replication-restricted enteroviral genomes in heart muscle induces defective excitation-contraction coupling and dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 102(7): 1444-53.
- Whitton JL, Cornell CT, Feuer R. 2005. Host and virus determinants of picornavirus pathogenesis and tropism. *Nat Rev Microbiol* 3(10): 765-76.
- Wilsky S, Sobotta K, Wiesener N, Pilas J, Althof N, Munder T, Wutzler P, Henke A. 2011. Inhibition of fatty acid synthase by amentoflavone reduces coxsackievirus B3 replication. *Arch Virology*. 157(2):259-69.
- Wojnicz R, Nowalany-Kozielska E, Wojciechowska C, Glanowska G, Wilczewski P, Niklewski T, Zembala M, Polonski L, Rozek MM, Wodniecki J. 2001. Randomized, placebo-controlled study for immunosuppressive treatment of inflammatory dilated cardiomyopathy: two-year follow-up results. *Circulation* 104(1): 39-45.
- Wu CH, Ho YS, Tsai CY, Wang YJ, Tseng H, Wei PL, Lee CH, Liu RS, Lin SY. 2009. In vitro and in vivo study of phloretin-induced apoptosis in human liver cancer cells involving inhibition of type II glucose transporter. *Int J Cancer* 124(9): 2210-19.
- Wulzinger M. 2000. „Axel, das ist das Ende“. 52:162-65.
- Xin L, Xiao Z, Ma X, He F, Yao H, Liu Z. 2014. Coxsackievirus B3 induces crosstalk between autophagy and apoptosis to benefit its release after replicating in autophagosomes through a mechanism involving caspase cleavage of autophagy-related proteins. *Infect Genet Evol* 26: 95-02.
- Yajima T. 2011. Viral myocarditis: potential defense mechanisms within the cardiomyocyte against virus infection. *Future Microbiol* 6(5): 551-66.
- Yanagawa B, Spiller OB, Choy J, Luo H, Cheung P, Zhang HM, Goodfellow IG, Evans DJ, Suarez A, Yang D, McManus BM. 2003. Coxsackievirus B3-associated myocardial pathology and viral load reduced by recombinant soluble human decay-accelerating factor in mice. *Lab Invest* 83(1): 75-85.
- Yang W, Hood BL, Chadwick SL, Liu S, Watkins SC, Luo G, Conrads TP, Wang T. 2008. Fatty Acid Synthase Is Upregulated during HCV Infection and Regulates HCV Entry and Production. *Hepatology* 48(5): 1396-03.
- Yoder JD, Cifuentes JO, Pan J, Bergelson JM, Hafenstein S. 2012. The crystal structure of a coxsackievirus B3-RD variant and a refined 9-angstrom cryo-electron microscopy reconstruction of the virus complexed with decay-accelerating factor (DAF) provide a new footprint of DAF on the virus surface. *J Virol* 86(23): 12571-81.
- Zavate O, Avram G, Pavlov E, Burlea-Irliciu A, Ivan A, Cotor F. 1984. Coxsackie A virus-associated herpeticiform angina. *Virologie* 35(1): 49-53.
- Zhang X, Zheng Z, Shu B, Liu X, Zhang Z, Liu Y, Bai B, Hu Q, Mao P, Wang H. 2013. Human Astrocytic Cells Support Persistent Coxsackievirus B3 Infection. *J Virol* 87(22): 12407-21.
- Zhou Y, Frey TK, Yang JJ. 2009. Viral calciomics: interplays between Ca<sup>2+</sup> and virus. *Cell Calcium* 46(1): 1-17.
- Zimmer M. 2009. GFP: from jellyfish to the Nobel prize and beyond. *Chem Soc Rev* 38(10): 2823-32.

## 10 Anhang

### 10.1 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Professor Dr. Andreas Henke,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 19. 07. 2016

---

Elisabeth Ammer

## 10.2 Danksagung

Zum Zustandekommen der vorliegenden Arbeit haben etliche Personen mit teilweise erheblichem Einsatz beigetragen.

Herr Professor Dr. Andreas Henke überließ mir das Thema und hatte bei allen aufgetretenen Schwierigkeiten, seien es Fragen zum Versuchsaufbau, Problemen mit dem Mikroskop oder der Nachbestellung zur Neige gehender Substanzen, ein offenes Ohr. Nie vermittelte er mir das Gefühl, dass er Wichtigeres zu tun habe oder sich von meinen Fragen gestört fühle. Sein Engagement war außergewöhnlich und alles andere als selbstverständlich. Auch für die bisweilen schwierige Vereinbarkeit von Studium und Promotion brachte er viel Verständnis auf, beriet mich und unterstützte mich in meinen Entscheidungen.

Christian Rien wies mich in die Laborarbeit ein und opferte viel Freizeit um mich mit Methoden und Geräten vertraut zu machen sowie geduldig meine zahlreichen Fragen zu beantworten.

Herr Dr. Sandor Nietzsche half mir mit der Anfertigung der elektronenmikroskopischen Bilder und ließ sich durch anfängliche Rückschläge nicht beirren. Er hatte immer viel Zeit für mich und „meine Viren“.

Meine Mutter Sabine Ammer beantwortete auch zu Unzeiten die eine oder andere Frage zu Chemie und mein Vater Christian Ammer half mit Tipps und Unterstützung bei kleineren und größeren Computerpannen. Beide motivierten mich immer wieder, wenn ich zwischenzeitlich „kein Land sah“.

Meine Schwestern Dorothee und Luise Ammer standen mit ihrem mathematischen Sachverstand bei statistischen Problemen aller Art stets mit Rat und Tat zur Seite. Glücklicherweise ließen sie sich auch durch mein begrenztes Können nicht abschrecken und opferten viel ihrer knapp bemessenen Zeit.

Mein Freund Christoph Herrmenau unterstütze mich in vielfältiger Weise: er beruhigte mich, wenn ein Experiment missglückt war, las das Manuskript gründlicher als ich, stellte entscheidende Verständnisfragen und legte bei Schwachstellen „den Finger in die Wunde“. Seine Fürsorge und Anerkennung waren stets ein großer Rückhalt für mich.

Allen genannten Personen danke ich von ganzem Herzen!